WIRKUNG VON MORPHIN AUF DEN DOPAMINSTOFFWECHSEL IM CORPUS STRIATUM VON RATTEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Angelika Bosse
aus Pößneck/Thüringen

Göttingen 1976

WIRKUNG VON MORPHIN AUF DEN DOPAMINSTOFFWECHSEL IM CORPUS STRIATUM VON RATTEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Angelika Bosse
aus Pößneck / Thüringen

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Privatdozent Dr. A. Zeeck

Korreferent: Professor Dr. W. Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.4.1976

Herrn Privatdozent Dr. K. Kuschinsky danke ich herzlich für die Themenstellung, besonders aber für die hilfreiche Unterstützung und die vielseitigen Anregungen und Diskussionen bei der Durchführung der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0049

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
	1. Allgemeines zur Nervenphysiologie	1
	2. Problemstellung	8
II.	Methoden	11
	1. Allgemeines	11
	2. Durchführung der Versuche	12
	a) Versuchsaufbau	12
	b) Präparation	13
	c) Inkubation und Abgabe	13
	d) Akute und chronische Behandlung mit Morphin in vivo	14
	e) Verwendete Inkubationslösungen	14
	3. Aufarbeitung der Gewebe	16
	a) Aufbereitung des im Gewebe vorhandenen ^{14}C-Dopamins und seiner Metabolite für die Szintillationsmessung und Auswertung	16
	b) Abtrennung des Dopamins von seinen Metaboliten	17
	c) Aufarbeitung für die fluorometrische Messung und Auswertung	18
III.	Ergebnisse	20
	1. Kinetik der Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Gewebeschnitte des Corpus striatum	20
	2. Bestimmung des reinen Anteils an ^{14}C-Dopamin und der ^{14}C-Aktivität in den anderen Fraktionen	21
	3. Vergleichende Versuche mit verschiedenen Pharmaka	23
	a) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe	23
	b) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Morphin in vitro	25

Seite

c) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Amphetamin in vitro 28

d) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Imipramin in vitro 30

e) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Äthanol in vitro 33

f) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Pentobarbital in vitro 35

4. Versuche an Schnitten Morphin-behandelter Ratten 40

a) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von akut mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe 40 40

b) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe (40 min. nach der letzten Injektion) 42

c) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe (18 Std. nach der letzten Injektion) 44

d) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe (43 Std. nach der letzten Injektion) 47

e) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten, denen Naloxon in vivo verabreicht worden war. 49

Seite

f) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (40 min. nach der letzten Injektion) und Zugabe von Naloxon in vitro 51

IV. Diskussion 54

V. Zusammenfassung 62

VI. Literaturverzeichnis 64

Verzeichnis der Tabellen

Seite

Tabelle 1: ^{14}C-Aktivität und mittlerer Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ in prozentualer Verteilung auf die einzelnen Fraktionen 21

2: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums 23

3: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe nach 45 min. Aufnahme und 2 min. Abgabe (an Schnitten des Striatums) 25

4: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einfluß von Morphin in vitro 26

5: Vergleich des ^{14}C-Gehalts im Gewebe des Striatums mit der fluorometrisch bestimmten Menge an Dopamin nach 45 min. Aufnahme und 2 min. K^+ stimulierte Abgabe unter Einfluß von Morphin 26

6: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Amphetamin in vitro 28

7: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einwirkung von Amphetamin in vitro (an Schnitten des Striatums) 30

8: Aufnahme und K^+stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einfluß von Imipramin in vitro 31

9: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einfluß von Imipramin in vitro 31

Seite

Tabelle 10: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Äthanol in vitro 33

11: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einfluß von Äthanol in vitro 35

12: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einfluß von Pentobarbital in vitro 36

13: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einfluß von Pentobarbital in vitro 37

14: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 40 min. nach akuter Gabe von 20 mg/kg Morphin 40

15: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums nach akuter Gabe von Morphin 42

16: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 40 min. nach der letzten chronischen Gabe von Morphin 43

17: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums, nach chronischer Gabe von Morphin (40 min. nach der letzten Injektion) 44

18: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 18 Std. nach der letzten chronischen Injektion von Morphin 45

Seite

Tabelle 19: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums (18 Std. nach der letzten chronischen Gabe von Morphin) 45

20: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 43 Std. nach der letzten chronischen Injektion 47

21: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums (43 Std. nach der letzten chronischen Gabe von Morphin) 48

22: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chron. mit Morphin behandelten Ratten unter Gabe von Naloxon in vivo 49

23: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und zusätzlicher Gabe von Naloxon in vivo 51

24: Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums nach chronischer Morphinbehandlung der Ratten und Zusatz von Naloxon in vitro 52

25: Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums chronischer Morphinratten (Zusatz von Naloxon in vitro) 53

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildungen: Seite

1. Synthese und Abbau von Dopamin 7
2. Wasserbad mit Schnitten zur Inkubation 12
3. Diagramm zur Berechnung der wahren Anzahl der Zerfälle/min. (dpm) bei der Szintillationszählung 16
4. Kinetik der Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in Gewebeschnitte des Striatums 20
5. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums 24
6. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Morphin in vitro und Kontrollwerte 27
7. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Amphetamin in vitro und Kontrollen 29
8. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Imipramin in vitro und Kontrollwerte 32
9. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Äthanol in vitro und Kontrollwerte 34
10. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Pentobarbital in vitro und Kontrollwerte 37

Abbildungen: Seite

11. Abgabe von ^{14}C-Dopamin halb. log. neutral und unter Einwirkung von Pharmaka (Morphin, Amphetamin, Imipramin, Äthanol, Pentobarbital) in vitro 38

12. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von akut mit Morphin behandelten Ratten und Kontrollwerte 41

13. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (40 min. nach der letzten Injektion) und Kontrollen 43

14. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (18 Std. nach der letzten Injektion) und Kontrollen 46

15. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (43 Std. nach der letzten Injektion) und Kontrollwerte 48

16. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten unter Zugabe von Naloxon in vivo und Kontrollwerte 50

17. Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten, unter Zugabe von Naloxon in vitro und Kontrollwerte 52

Abbildungen

		Seite
18.	Schema einer dopaminergen Nervenendigung	54
19.	Darstellung der postsynaptischen Überempfindlichkeit	58
20.	Präsynaptischer Wirkungsmechanismus von Opiaten nach der Hypothese von Kosterlitz und Hughes	61

I. Einleitung

1. Allgemeines zur Nervenphysiologie

Das Gehirn ist das am höchsten spezialisierte Organ aller Säugetiere. Man kann das Gehirn von Säugetieren morphologisch in sechs Teile einteilen: Stammhirn, Mittelhirn, Kleinhirn, Zwischenhirn, Basalganglien und Großhirn [1,2,3].

Das Großhirn hat sich stammesgeschichtlich von den ersten Säugetieren bis zu den Primaten und zum Menschen am weitesten fortentwickelt und ist für die willkürlichen Handlungen, so wie für Intelligenz und Lernvermögen von besonderer Bedeutung.

Die anderen Hirnteile haben sich weniger in ihrer Funktion und relativen Größe verändert und entsprechen damit ziemlich der Urform des Säugetierhirns. Diese Teile nehmen Funktionen wie Wahrnehmung, Motorik und Reflexe wahr. Alle Hirnteile stehen über Nervenbahnen miteinander in Verbindung.

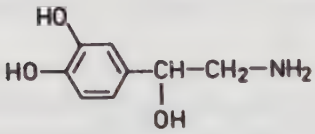
Es gelang, wenn auch nur in beschränktem Umfang, verschiedenen Hirnbezirken bestimmte Funktionen zuzuordnen: Das Striatum z.B., ein Teil der basalen Stammganglien ist eines der motorischen Zentren. In der Medulla oblongata (Verlängerung des Rückenmarks) sind die Kreislaufreflexe, Brech- und Schluckreflexe lokalisiert. Hierbei handelt es sich um eine grobe Einteilung, da ja die Hirnbezirke anatomisch und funktionell miteinander verbunden sind und sich mehr oder weniger stark gegenseitig beeinflussen.

Die Übertragung von Impulsen im Gehirn erfolgt durch Signale, die von einer Nervenzelle (einem Neuron) auf die nächste weitergeleitet werden [6]. Jede Nervenzelle setzt sich in vielen Ausläufern fort, den Dendriten und einem einzigen, besonders langen, dünnen Fortsatz, dem Axon. Die Dendrite sowie die Zellkörper selbst, nehmen in der Regel Reize auf, die Axone (Neurite) leiten sie auf die nächste Nervenzelle weiter und zwar über die Synapsen, die sich am Ende der Axone befinden. Zwischen dem Ende des Axons und der benachbarten postsynaptischen Zelle befindet sich der synaptische Spalt, ein Zwischenraum von etwa 200 Å Weite [4, 15, 21].

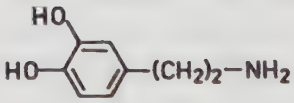
Die Weiterleitung eines Impulses entlang der Nervenzellen erfolgt auf elektrischem Wege durch eine kurzfristige Depolarisation der Axon-Membran, die Übertragung auf die benachbarte Nervenzelle erfolgt an den Synapsen auf chemischem Wege und zwar mittels Überträgersubstanzen (Neurotransmitter, Transmitter [4, 9]).

Von den Neurotransmittern nimmt man an, daß sie in den Vesikeln, auch Granula genannt, (kleinen Bläschen in der Nervenendigung nahe der Synapse) gespeichert sind und bei Bedarf an die Membran der Synapse transportiert werden, wo sie sich in den synaptischen Spalt entleeren [61]. Die Transmitter reagieren mit einem spezifischen postsynaptischen Rezeptor der benachbarten Nervenzelle. Dadurch kommt es zu einer veränderten Ionenpermeabilität, die zunächst auf einen kleinen, postsynaptischen Bereich beschränkt ist und sich dann rasch auf die gesamte Nervenzelle ausbreitet.

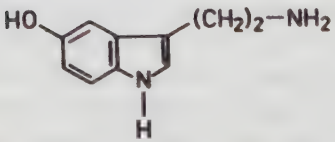
Als Überträgersubstanzen fungieren im Gehirn z.B.:



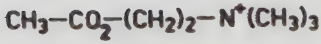
Noradrenalin



Dopamin



Serotonin

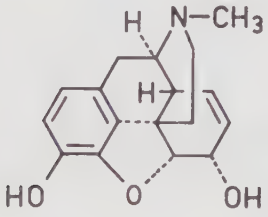


Acetylcholin

Die Verteilung der Transmitter im Nervensystem und auch im Gehirn ist sehr unterschiedlich [43, 53, 54]. Acetylcholin findet man z.B. in besonders hoher Konzentration an den autonomen Ganglien und im Nucleus caudatus, Noradrenalin im Hirnstamm und in der Hirnrinde, Serotonin findet man besonders im Hypothalamus. Dopamin ist ein Transmitter, der in den Zentren des extrapyramidalen motorischen Systems vorkommt. Dazu gehört auch das Corpus Striatum [5,7,8,10,11, 17,19,78].

Durch die Verabreichung von Pharmaka kann man Einfluß auf die Transmittersubstanzen im Gehirn nehmen, z.B. kann die Aufnahme und Abgabe von Transmittern verändert werden, etwa ihre Speicherfähigkeit in den Granula und der Abbau der Transmitter in der (Abb. 1) Synapse [12,14,18,22]. Hierzu muß das Pharmakon in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Das heißt, die Substanz muß in der Lage sein, in genügend hoher Konzentration in das Gehirn einzudringen, um eine Wirkung auszuüben.

Diese Gedankengänge gelten auch für Morphin, dessen Wirkung auf



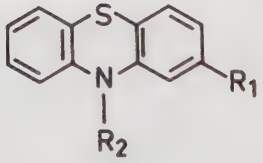
Morphin

das Zentralnervensystem schon sehr lange bekannt ist. Da Morphin eine Substanz darstellt, die mit gut definierten Rezeptoren reagiert, scheint sie besonders geeignet zu sein um Arzneimittelgewöhnung und Abhängigkeit zu untersuchen. Besondere Bedeutung scheint der Wirkung

des Morphins auf den Dopaminstoffwechsel im Gehirn zuzukommen. Verabreicht man z.B. einer Ratte einmalig Morphin, so treten bei ihr Symptome auf, die bei Mangelerscheinungen an Dopamin im Gehirn auftreten: Katalepsie, Akinese und Rigidität ', also eine mehr oder weniger weitgehende Hemmung der spontanen Motorik ist die Folge.

Da 70 Prozent des gesamten Gehirn-Dopamins im Corpus striatum gefunden wird, soll dieser Hirnbezirk genauer analysiert werden, vor allem auch deshalb, weil seine Beziehung zur Motilität und Motorik, also zu Bewegungsabläufen, relativ gut erforscht ist [16,27,29,81].

Ähnliche Symptome wie durch Morphin werden auch durch Neuroleptika '' hervorgerufen [13,20]. Neuroleptische Wirkung haben Phenothiazinderivate mit piperazinhaltigen oder aliphatischen Seitenketten, wie Fluphenazin und Chlorpromazin,



Phenothiazine

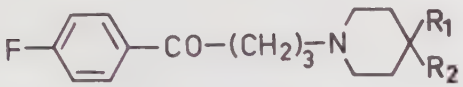
' Katalepsie: Einhalten einer unnatürlichen Körperstellung länger als normal

Akinese : Bewegungshemmung, körperliche Erstarrung

Rigidität : Muskelversteifung der Gesichts- und Rückenmuskulatur

'' Neuroleptika: Pharmaka mit dämpfender und antipsychotischer Wirkung

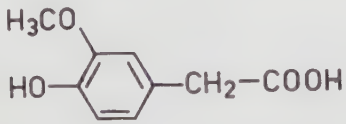
sowie bestimmte Butyrophenonderivate.



Butyrophenone

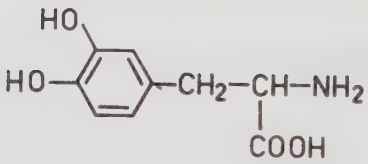
Neuroleptika blockieren die postsynaptischen Rezeptoren. Wahrscheinlich als Folge dieses Effektes wird kompensatorisch mehr Transmitter präsynaptisch gebildet und in den synaptischen Spalt abgegeben. Dies ist wohl als Versuch anzusehen, diese Blockade zu überwinden [24].

Auch nach der Verabreichung von Morphin kommt es zu einer Katalepsie mit einem Erscheinungsbild, das dem nach Neuroleptika sehr ähnlich ist. Nach Morphin, wie auch nach Neuroleptika erfolgt ein Anstieg der Homovanillinsäure, einem Abbauprodukt des Dopamins im Corpus striatum [85].



Homovanillinsäure

Bis hierher gleichen sich die Effekte von Morphin und Neuroleptika [23,26,13]. Jedoch gibt es auch Befunde, die für unterschiedliche Wirkungsmechanismen beider sprechen. Z.B. läßt sich Katalepsie nach Morphingabe durch L-Dopa, der Vorstufe des Dopamins, leicht wieder aufheben (s. Abb.1).



L-Dopa

Gibt man aber L-Dopa nach einem Neuroleptikum, so hat dies nahezu keine Wirkung. Auch kann nach einer Dosis von Neuroleptika, die den Dopamin-Umsatz maximal erhöht, Morphin noch eine zusätzliche Erhöhung bewirken, was ebenfalls für einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus von Morphin und Neuroleptika spricht [27].

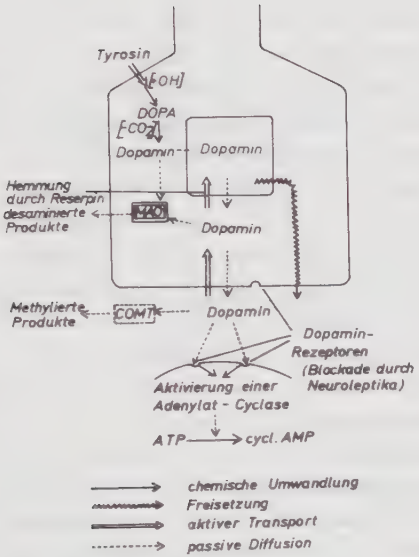
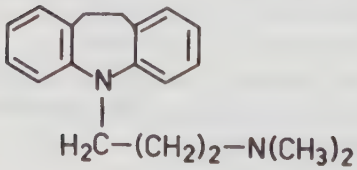


Abb. 1 Synthese und Abbau von Dopamin
Aus Tyrosin wird durch Hydroxylierung L-Dopa gebildet, durch Decarboxylierung von L-Dopa bildet sich Dopamin. Der Abbau des Dopamins erfolgt entweder in der Nervenendigung durch MAO (Monoaminooxydase) oder außerhalb der Nervenendigung durch COMT (Catechol-o-methyltransferase).
ATP (Adenosintriphosphat) in der Postsynapse wird in cycl-AMP (cycl.-Adenosinmonophosphat) durch die aktivierte Adenylcyclase umgewandelt. Es handelt sich hierbei um eine Folgereaktion der Transmitterausschüttung (hier von Dopamin).

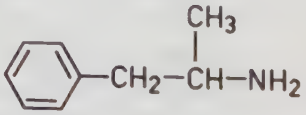
2. Problemstellung

Die von der Substantia nigra, einem im Mittelhirn liegenden Bezirk, zum Corpus striatum führenden Neurone enthalten im Bereich ihrer Nervenendigungen, d.h. im Corpus striatum, den weitaus größten Teil des Dopamins. Es wurde vermutet, daß Morphin die Speicherung oder Freisetzung des Dopamins in den Nervenendigungen beeinflußt [27]. Deshalb soll die Wirkung des Morphins auf die Aufnahme und Abgabe von Dopamin an Schnitten des Striatums in vitro näher untersucht werden, um Aufschluß über die Wirkungsweise von Morphin auf den Transmitter Dopamin in vitro zu erhalten. Die Morphinwirkung auf den Dopaminstoffwechsel könnte ein brauchbares Modell sein, um die direkte Morphinwirkung und den Mechanismus der Gewöhnung und Abhängigkeit auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Es werden Schnitte des Striatums gewählt, weil man an ihnen gut die Aufnahme in und die Freisetzung von Dopamin aus den Nervenenden untersuchen kann, ohne daß, wie es im intakten Gehirn geschieht, andere Hirnbezirke die Funktion dieses Bereiches beeinflussen.

Zur Klärung des Wirkungsmechanismus des Morphins soll der Effekt dieser Substanz auf die Aufnahme und Abgabe von Dopamin mit denen anderer Pharmaka verglichen werden. Gewählt wurden Amphetamin und Imipramin, die schon in vivo untersucht worden sind und deren Wirkung auf den Dopaminstoffwechsel schon weiter geklärt ist als der des Morphins [30, 31, 32, 33, 34, 35, 37].

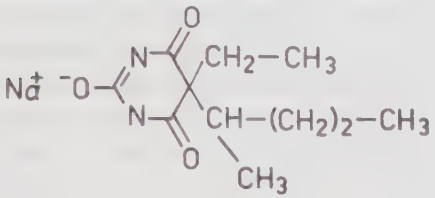


Imipramin



Amphetamin

Bei Pentobarbital und Äthanol ist die Wirkungsweise auf Transmittersubstanzen hingegen nur wenig bekannt. Auch diese beiden Substanzen werden mit Morphin in vitro verglichen.[38,39,40,41]



Pentobarbital-Natrium

Die akute Wirkung des Morphins auf Ratten (Katalepsie, Akinese, Rigidität) unterscheidet sich von der chronischen Wirkung [12,23,50,82]. Es kommt nach chronischer Gabe von Morphin zu einer Aktivierung der Motorik, ferner zeigen die Ratten ein charakteristisches Nagen und Kauen. Dies läßt auf eine Aktivierung der Dopaminabgabe schließen, weil andere Substanzen, die entweder direkt Dopamin spezifische Rezeptoren erregen oder die Freisetzung von Dopamin erhöhen, also auf die eine oder andere Art dopaminerge-Signale übermitteln, ähnliche Effekte haben. Man kann also annehmen, daß die chronische Gabe von Morphin die Aktivität der dopaminergen Neurone erhöht. Es scheint sich hier um einen Anpassungsprozess zu handeln, um die nach akuter Gabe von Morphin auftretende Hemmung der dopaminergen Transmission aufzuheben [44,46,47,51].

Zu welchen Veränderungen dies führt und welche Einwirkung es auf die Aufnahme und Abgabe des Transmitters Dopamin hat, soll an isolierten Schnitten des Striatums von Ratten untersucht werden, und zwar nach akuter und chronischer Gabe von Morphin und im Entzug [36,52,84].

Die hier auch zu untersuchende Abgabe des Dopamins aus den Gewebeschnitten des Striatums erfolgt normalerweise äußerst langsam und spiegelt wahrscheinlich zum Teil eine unspezifische Schädigung des Gewebes wieder. Mit einer Erhöhung der K^+ Ionen im Inkubationsmedium hingegen, kann man eine spontane Abgabe von Dopamin aus den Schnitten veranlassen. Die K^+ Ionen rufen eine Depolarisation der Zellmembran hervor und einen Einstrom von Ca^{++} Ionen, welche dann eine Freisetzung von Dopamin oder an anderen Geweben auch von anderen Neurotransmittern bewirken. In vitro kann somit ein solcher physiologischer Prozess mit einiger Genauigkeit simuliert werden [63].

II. Methoden

1. Allgemeines

Fluoreszenzmessungen wurden auf einem Fluoreszenzspektrometer SF-1 Fluorispec der Firma Baird-Atomic-Inc., Cambridge, Massachusetts registriert, (USA)

^{14}C wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Modell LS-250 der Firma Beckmann, gemessen (USA).

Wenn bei den Versuchen nicht einzeln aufgeführt, wurden Pharmaka und Reagenzien folgender Hersteller verwendet:
- Morphinhydrochlorid, Merck, Darmstadt
- ß-Phenylisopropylamin (d-Amphetaminsulfat), Merck, Darmstadt
- 10.11-Dihydro-5- (3-dimethylaminopropyl)- 5H-dibenzazepin (Imipramin)
- 5-Äthyl-5-isopentylbarbitursäurenatriumsalz (Pentobarbital), Merck, Darmstadt
- Naloxonhydrochlorid, Endo Lab. - Garden City, N.Y. (USA)
- ß-(3,4-Dihydroxyphenyl-) äthylamin (Dopamin), Serva, Heidelberg
- 3-Methoxytyramin, Sigma Chem. Comp., St. Luis (USA)
- Soluene zum Homogenisieren, Firma Packard
- Dimilume für die Szintillationsmessung, Firma Packard
- 2'-^{14}C -3,4-Dihydroxyphenyl-(2'äthylamin), (^{14}C-Dopamin), Amersham-Buchler, Braunschweig

Für die Versuche wurden männliche Albinoratten der Rasse Wistar TNO / W70, 140 - 180 g, der Firma Winkelmann, Paderborn verwandt.

2. Durchführung der Versuche

a) Versuchsaufbau

Zur Versuchsdurchführung wurde folgender apparativer Aufbau verwandt: Ein gläsernes, heizbares Wasserbad 20 x 40 cm in einem Stahlgestell wurde 10 cm hoch mit Wasser gefüllt und mit Ständern für 2 x 6 Proben versehen. Die Badtemperatur wurde über ein Kontaktthermometer geregelt. An einer Längsseite des Wasserbades befand sich ein Zuleitungsschlauch für Carbogen (95% O_2 + 5% CO_2), mit sechs Abzweigungen. Jede Schlauchleitung war mit einer Schlauchklemme versehen, um die Durchgasung für jede angeschlossene Probe individuell zu regeln.

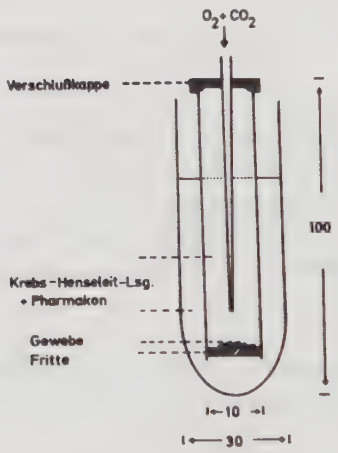


Abb. 2 Wasserbad mit Schnitten zur Inkubation

b) Präparation

Die Ratten werden dekapitiert, der Schädel geöffnet und das Gehirn entnommen. Die beiden Striata wurden auf einem mit 0,9% Natriumchloridlösung getränkten Filterpapier präpariert. Dieses Filterpapier befand sich in einer eisgekühlten Petrischale. Die so präparierten Striata wurden auf trockenes Filterpapier gegeben, mit einem Mikrotom wurden 300 µm dicke Schnitte hergestellt. Um das Gewebe nicht zu schädigen, wurde die Zeit zwischen Dekapitation und Inkubation kürzer als fünf Minuten gehalten. Je ein Corpus striatum wurde für eine Messung verwendet [28,62].

c) Inkubation und Abgabe

Für die eigentliche Versuchsdurchführung wurden Glasröhrchen (Durchmesser 1,0 cm) mit herausnehmbarer Fritte verwandt. Jedes Glasrohr war mit einer Gaszuleitung versehen, so daß von unten Carbogen durch die Proben perlen konnte . (Abb.2) Für die Inkubation wurden die Schnitte auf eine Fritte gegeben, in das Glasrohr eingesetzt und dieses dann in Zentrifugengläser, die mit 6 ml Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt waren, gestellt [64]. Man ließ 15 Minuten lang Carbogen durch die Proben perlen (Vorinkubation), um die einzelnen Schnitte optimal voneinander zu trennen. Während des gesamten Versuchs wurden die Zentrifugengläser in einem Wasserbad bei 37°C gehalten und ständig mit Carbogen durchgast [28].

Nach der Vorinkubation wurden die Glasröhrchen zur Aufnahme des Dopamins in Zentrifugengläsern, die mit ^{14}C-dopaminhaltiger Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt waren, gestellt. Diese Lösung enthielt, je nach Versuch, zusätzlich noch ein Pharmakon. Die maximale Inkubationszeit betrug 45 Minuten.

Zur Messung der K^+ stimulierten Abgabe wurden die Schnitte zuerst 45 Minuten lang mit ^{14}C-Dopamin inkubiert, anschließend wurden die Röhrchen aus der dopaminhaltigen Krebs-Henseleit-Lösung entfernt

und in Zentrifugengläser gestellt, die 6 ml einer K^+-reichen, die Abgabe von Dopamin stimulierenden Krebs-Henseleit-Lösung enthielt. Auch dies geschah mit oder ohne Zusatz von Pharmakon in der Abgabelösung.
Anschließend wurden die Schnitte aus dem jeweiligen Medium entfernt, zwischen Filterpapier aussen getrocknet und gewogen. Die Schnitte wurden dann verschieden weiter verarbeitet.

d) Akute und chronische Behandlung mit Morphin in vivo

Bei der akuten Behandlung von Ratten, wird diesen je 20 mg Morphin/kg Körpergewicht subkutan injiziert. Kontrollratten wurde die entsprechende Flüssigkeitsmenge pro Körpergewicht an 0,9%iger Kochsalzlösung injiziert [83,86].

Für die chronische Behandlung der Morphinratten und der Kontrollratten wurde wie folgt vorgegangen: Die Ratten wurden in zwei Gruppen eingeteilt und gewogen. Der einen Gruppe wurde täglich zweimal Morphin injiziert und zwar an den ersten beiden Tagen je 10 mg/kg, an den beiden darauffolgenden Tagen je 15 mg/kg und später dann je 20 mg/kg intraperitoneal.

Der Gruppe der Kontrollratten wurde zweimal täglich die entsprechende Flüssigkeitsmenge an Kochsalzlösung injiziert. Die Injektionen erfolgten jeweils um ca. 9^{00} Uhr und um ca. 18^{00} Uhr.

e) Verwendete Inkubationslösungen

Krebs-Henseleit-Lösung zum Vorinkubieren und zur Aufnahme von Dopamin in die Gewebeschnitte [64].
Es handelt sich um eine isotone Lösung folgender Zusammensetzung: 0,154 M NaCl, 0,006 M KCl, 0,003 M $CaCl_2$, 0,002 M KH_2PO_4, 0,002 M $MgSO_4 \times 7H_2O$ und 0,03 M $NaHCO_3$ (Die Natriumhydrogencarbonatlösung wird eine Stunde mit CO_2 durchgast.) Ausserdem enthält die

Krebs-Henseleit-Lösung noch 1 x 10^{-2} M D-Glukose, 1,14 x 10^{-3} M L-Ascorbinsäure und 5 x 10^{-5} M Äthylendiamin-tetraessigsäure. Die fertige Lösung wird eine Stunde mit Carbogen durchgast.

Krebs-Henseleit-Lösung zur Abgabe des Dopamins aus den Gewebeschnitten: 0,101 M NaCl, 0,053 M KCl, die Konzentrationen der anderen Bestandteile entsprechen denen für die Aufnahme von Dopamin. Da K^+ Ionen die Abgabe des Dopamins stimulieren, wird ein Teil der Na^+ Ionen hier durch K^+ Ionen ersetzt.

- ^{14}C-Dopaminlösung

Es wird eine 4 x 10^{-9} molare Lösung von ^{14}C-Dopamin in Krebs-Henseleit-Lösung zur Aufnahme angesetzt. Um die Reinheit des ^{14}C-Dopamins zu prüfen, wurde es in Abständen von 4 Wochen auf Celluloseplatten dünnschichtchromatographiert. Als Laufmittel wurde n-Butanol : Eisessig : H_2O (6:2:2) verwandt.

3) Aufarbeitung der Gewebe

a) Aufbereitung des im Gewebe vorhandenen ^{14}C-Dopamins und seiner Metabolite für die Szintillationsmessung und Auswertung

Auswertung

Die getrockneten und ausgewogenen Schnitte wurden in Zählgläser überführt und dort mit 0,3 ml Soluene versetzt und zur Homogenisierung 90 Minuten im Trockenschrank bei 30°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde zu jeder Probe 10 ml Dimilume zugefügt. Auch vom Inkubationsmedium, das ^{14}C-Dopamin enthält, wurden 1 ml entnommen und mit Dimilume versetzt.

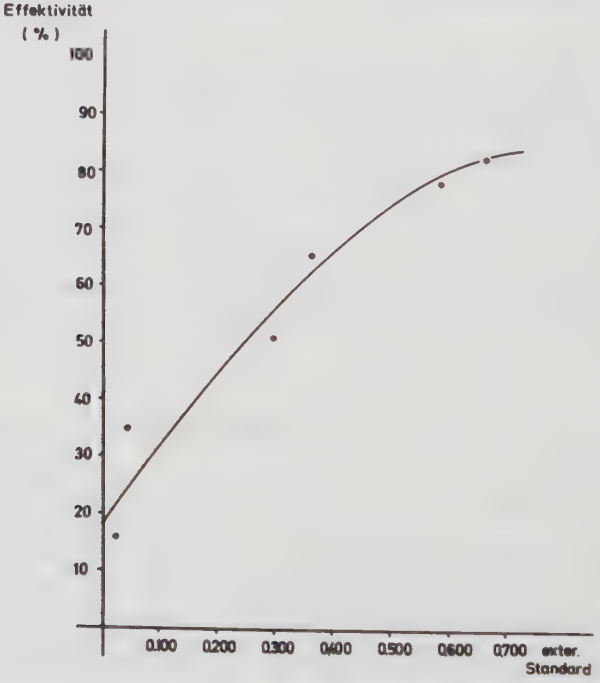


Abb. 3 Diagramm zur Berechnung der wahren Anzahl der Zerfälle/min (dpm) bei der Szintillationszählung

Der ^{14}C-Gehalt aller dieser Proben wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler gemessen.
Die ausgedruckten Werte des Szintillationszählers wurden wie folgt korrigiert (Abb. 3).
Nach Abzug des Hintergrundes ("Blank") wurde die Zählerausbeute des Szintillationsgerätes bestimmt. Zu diesem Zweck wurde mit $CHCl_3$ gequenchtes ^{14}C-Toluol gemessen und gegen den externen Standard aufgetragen. An Hand des so erhaltenen Diagramms (Abb. 3) kann man für die Proben die 100%ige Ausbeute bestimmen, da ja der externe Standard bei jeder Messung mit ausgedruckt wird [65,66,67,68].
Die erhaltenen Werte werden auf 1 g Gewebe umgerechnet. Die in den späteren Diagrammen aufgetragenen Gewebe/Medium-Quotienten (T/M) stellen das Verhältnis von dpm/g Gewebe zu dpm/ 1 ml ^{14}C-Dopamin-haltigen Inkubationslösung dar. Die Werte, die unter Einfluß der verschiedenen Pharmaka erhalten wurden, wurden mit den Kontrollwerten der gleichen Zeitreihe mittels des Student's t-Test verglichen [91].

b) Abtrennung des Dopamins von seinen Metaboliten

Zur fluorometrischen Bestimmung der Gesamtmenge an Dopamin und des prozentualen Anteils an ^{14}C-Dopamin im Gewebe muß das Dopamin von seinen Metaboliten abgetrennt werden. Dazu wurden die Schnitte wie oben beschrieben präpariert und inkubiert [70].

Nach dem Auswiegen wurden die Schnitte des Striatums mit 7 ml 4%iger Perchlorsäure homogenisiert und anschließend mit 1 ml einer 0,2 molaren Lösung von Äthylendiamin-tetraessigsäure versetzt. Das Homogenat wurde 20 Minuten bei +4°C gehalten und dann bei der gleichen Temperatur 20 min. lang bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit einer 20%igen Kaliumhydrogencarbonatlösung auf pH = 5,8 eingestellt. Es wurde noch einmal 10 Minuten bei 10 000 U/min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend säulenchromatographisch getrennt. Als Trägermaterial wurde ein saurer Ionenaustauscher

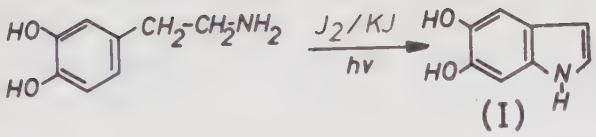
(Dowex 50W-X8, 200-400 mesh) verwendet. Die erste Fraktion wurde mit Wasser eluiert und enthielt L-Dopa und sein -O-methyliertes Produkt. Durch 9 ml 0,6 N Salzsäure wurde Noradrenalin und zuletzt Dopamin mit 10 ml 2,0 N Salzsäure eluiert [57].

Die einzelnen Fraktionen wurden bei 30°C im Vakuum eingedampft und mit 0,5 ml 0,02 N Salzsäure aufgenommen. Auch den Rückstand, den man nach dem ersten Mal Zentrifugieren erhielt, wurde mit 0,5 ml 0,02 N Salzsäure aufgenommen. Jede dieser Proben wurde mit 10 ml Dimilume versehen und die Szintillationsmessung durchgeführt. Der prozentuale Anteil an Radioaktivität der einzelnen Fraktionen zueinander und des festen Rückstandes wurde berechnet.

Die das ^{14}C-Dopamin enthaltende Fraktion wurde weiter an Hand der umgekehrten Isotopenverdünnungsanalyse untersucht. Dazu wurde das radioaktive Dopamin mit unmarkiertem Dopamin verdünnt und auf Celluloseplatten aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen ließ man Dopamin - 3-Methoxytyramin mitlaufen. Als Laufmittel benutzte man n-Butanol : Eisessig : Wasser (6 : 2:2). Das Chromatogramm wurde mit Ninhydrin entwickelt, und die Radioaktivität der angefärbten Dopaminfraktionen gemessen [58,59,60].

c) <u>Aufarbeitung für die fluorometrische Messung und Auswertung.</u>

Nach der Trennung von seinen Metaboliten wird die Dopamin-Fraktion eingedampft und mit 7 ml 0,02 N Salzsäure aufgenommen. Die Lösung wird auf drei Proben à 2 ml verteilt. Ein Wert fungiert als Meßprobe (S) für das vorhandene Dopamin, ein zweiter als innerer Standard (IS), diesem wird eine definierte Menge (0,2 µg) an Dopamin zugesetzt. Beide Proben werden mit Natriumacetat gepuffert und mit einer gesättigten Kaliumjodid/Jod-Lösung zu dem Indolderivat (I) umgesetzt. Nach drei Minuten wird die Oxidation zu dem Indolderivat mit Natriumsulfit (Na_2SO_3) gestoppt. Nach weiteren drei Minuten wird zur Stabilisierung Ascorbinsäure zugesetzt.



(I)

Mit dem Blindwert (TB) wird entsprechend verfahren, aber Natriumhydroxid, Natriumsulfit und Ascorbinsäure werden in umgekehrter Reihenfolge zugegeben. Die Proben werden anschließend 90 min. lang mit normalen Lampenlicht (60 W) bestrahlt. Danach wird die Fluoreszenz gemessen [71,72].

Die Auswertung erfolgt nach folgender Gleichung:

$$0{,}2\left[\frac{\mu g}{ml}\right] \cdot \frac{S\,[mA]}{IS\,[mA]} \cdot \frac{7}{2}\,[ml] \cdot \frac{1000}{x\,[mg]} = \left[\mu g/g\right]$$

Man erhält die Dopaminmenge pro 1 g Gewebe.

Wobei S[mA] die gemessene Probe abzüglich des Blindwertes (TB) darstellt und IS[mA] der innere Standard abzüglich S[mA], x ist die Einwaage an Gewebe in mg. Die Anregung erfolgt bei 330 nm und die Fluoreszenz wird bei 385 nm gemessen.

III. Ergebnisse

1. Kinetik der Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Gewebeschnitte des Corpus striatum

Es ist bekannt, daß die initiale Aufnahmegeschwindigkeit von Katecholaminen in verschiedene Gewebe einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Deshalb wurde zu Beginn der Untersuchungen geklärt, ob dies auch für die Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Corpus striatum gilt.

Es wurde die Aufnahme von markiertem Dopamin bei 37° C und 5 Minuten Aufnahmedauer bei verschiedenen ^{14}C-Dopaminkonzentrationen durchgeführt. Man trägt die reziproken Werte der Konzentration im Medium gegen die reziproken Werte der Dopaminkonzentration im Gewebe auf.

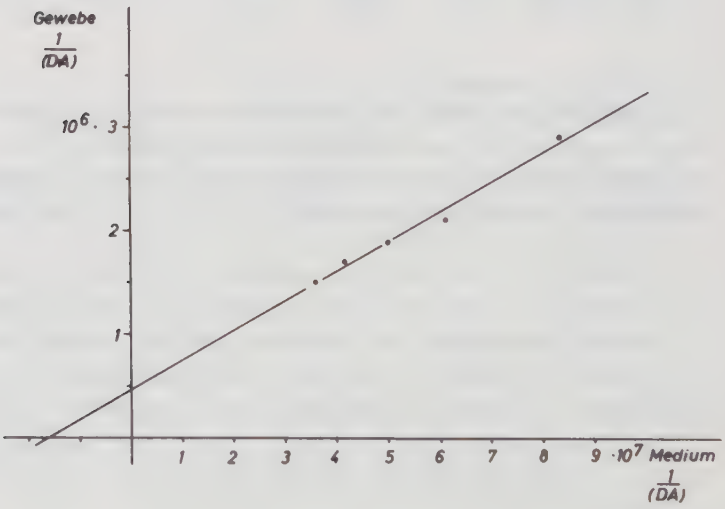


Abb.4 Kinetik der Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in Gewebeschnitte des Striatums.

An Hand der erhaltenen Gerade läßt sich nach Lineweaver und Burk die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit, K_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} berechnen [55, 56, 69].

Regressionsgerade:

$y = bx + a$

$b = 0{,}286$

$a = 0{,}0456 \times 10^{8}$

$K_m = 6{,}22 \times 10^{-7}$ mol/l

$V_{max} = 0{,}434 \times 10^{-10}$ /min. / mg Gewebe

Für die folgenden Versuche wurde die Dopaminkonzentration so gewählt, daß sie unter dem K_m-Wert liegt und somit eine Tracerkonzentration darstellt.

2. Bestimmung des reinen Anteils an ^{14}C-Dopamin und der ^{14}C-Aktivität in den anderen Fraktionen.

Nach dem Auftrennen wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen und des Rückstandes im Flüssingkeitsszintillationszähler gemessen.
Es ergab sich folgende prozentuale Verteilung von ^{14}C markierten Substanzen nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten.

Tab. 1 ^{14}C-Aktivität und mittlerer Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ in prozentualer Verteilung auf die einzelnen Fraktionen

"L-Dopa" Fraktion $s_{\bar{x}}$	"Noradrenalin" Fraktion $s_{\bar{x}}$	"Dopamin" Fraktion $s_{\bar{x}}$	Rückstand $s_{\bar{x}}$
18,7 ± 0,70	23,7 ± 1,78	48,3 ± 1,40	15,1 ± 0,57

Hierbei zeigt sich, daß das Dopamin schon bei der Aufnahme metabolisiert wird. Die säulenchromatographische Trennung zeigt, daß nach der Inkubation nur noch 48% als ^{14}C-Dopamin vorliegt. Der kleinste Teil des radioaktiven Rückstandes findet sich im festen Rückstand. Zu gleichen Teilen findet sich radioaktives Material in der L-Dopa- und der Noradrenalin-Fraktion.

Die Dopaminfraktion wird noch weiter auf Einheitlichkeit hin untersucht. Es könnte sein, daß sich ein Teil des Dopamins in 3-Methoxytyramin umgewandelt hat, das sich chromatographisch vermutlich ähnlich verhält wie Dopamin. Nach der umgekehrten Isotopenverdünnungsanalyse trägt man die mit nicht markiertem Dopamin versehene ^{14}C-Dopaminfraktion gegen reines Dopamin auf, hierbei zeigte sich, daß die "Dopamin"-Fraktion zu 76,7% aus reinem Dopamin besteht. Der Rest setzt sich offenbar aus 3-Methoxytyramin und nicht weiter untersuchten Metaboliten zusammen.

3. Vergleichende Versuche mit verschiedenen Pharmaka

a) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe

Um die weiteren Versuche unter dem Einfluß von Pharmaka durchzuführen, wurde der zeitliche Verlauf des Gehaltes der Striatumschnitte an ^{14}C während der Inkubation mit ^{14}C-Dopamin ermittelt. In weiteren Serien wurden die Schnitte mit ^{14}C-Dopamin äquilibriert (45 min.) und anschließend wurde die K^+ stimulierte Abgabe gemessen.

Es zeigte sich, daß nach 30 - 45 Minuten die Aufnahme des ^{14}C-Dopamins beendet war. Die Abgabe des Dopamins bei K^+ Stimulation erfolgte sehr rasch, fast vollständig, innerhalb von 5 Minuten. Aufgetragen wird der Gewebe/Medium-Quotient (T/M) gegen die Zeit [s.a. II.3.a)].

Tab. 2 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums

Zeit	Mittelwert Gewebe/Medium n = 6		mittlerer Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$
Aufnahme			
min.			
10	3,94	±	0,22
20	9,19	±	1,87
30	16,73	±	1,29
45	16,29	±	0,67
Abgabe			
sek.			
20	16,29	±	0,47
60	6,36	±	0,67
120	2,93	±	0,17
300	2,85	±	0,55

Bei allen Aufnahme- und Abgabemessungen von Dopamin unter der Einwirkung der verschiedenen Pharmaka, wurden parallel hierzu Schnitte des Striatums als Kontrollen inkubiert, die ausser dem Zusatz des Pharmakons den gleichen Aufnahme- und Abgabebedingungen unterlagen. Hierdurch sollten solche Effekte ausgeschlossen werden, die nicht auf das zugegebene Pharmakon zurückzuführen sind, dazu gehört z.B. der tägliche und jahreszeitliche Rhythmus im Transmitterhaushalt der Ratte.

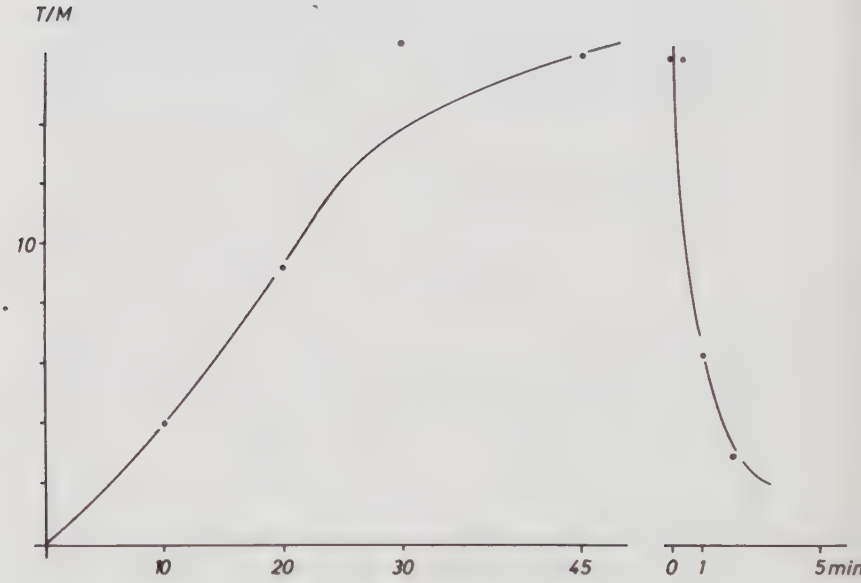


Abb. 5 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums

Für den Aufnahmewert ^{14}C-Dopamin 45 Minuten und die Abgabe bei 2 Minuten, wurde zusätzlich der Gesamtgehalt an Dopamin in den Gewebeschnitten fluorometrisch bestimmt. Damit sollen Veränderungen, die Aufnahme und Abgabe betreffend, im Gewebe festgestellt werden. Z.B. ob bei der Abgabe zuerst das neu aufgenommene Dopamin wieder abgegeben wird, oder das schon gespeicherte.

Tab. 3 Vergleich des absoluten Gehaltes an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe nach 45 Min. Aufnahme und 2 Min. Abgabe (an Schnitten des Striatums)

Zeit Min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamin-Gehalt ug/g Gew.	%
45 Aufn.	76000	100	9,87	100
2 Agb.	12500	17	1,87	19

Das mit chemischen Methoden gemessene Dopamin verhielt sich also bei der K^+ stimulierten Freisetzung sehr ähnlich wie das ^{14}C im Gewebe, was darauf schließen läßt, daß sich das ^{14}C-Dopamin gleichmäßig auf den gesamten Pool des Dopamins im Gewebe verteilt hatte.

b) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Morphin in vitro

Es wurde eine $3{,}5 \times 10^{-5}$ molare Morphinlösung hergestellt, die auf die Schnitte des Striatums bei der Aufnahme und Abgabe von ^{14}C-Dopamin einwirkte. Parallel hierzu ermittelte man Kontrollwerte ohne den Zusatz von Morphin. (T/M = Gewebe/Medium-Quotient)

Tab. 4 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einfluß von Morphin in vitro

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin $s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Kontrollen $s_{\bar{x}}$
	Aufnahme	
min.		
10	4,50 ± 0,31	3,99 ± 0,22
20	10,64 ± 1,20	9,30 ± 0,85
30	14,32 ± 0,77	16,53 ± 1,10
45	15,27 ± 0,44	16,09 ± 0,65
	Abgabe	
sek.		
20	12,46 ± 0,29	16,00 ± 0,44
60	8,50 ± 0,38	6,10 ± 0,65
120	4,78 ± 0,14	2,80 ± 0,11

Tab. 5 Vergleich des ^{14}C-Gehalts im Gewebe des Striatums mit der fluorometrisch bestimmten Menge an Dopamin nach 45 min. Aufnahme und 2 min. K^+ stimulierter Abgabe unter Einfluß von Morphin in vitro

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamingehalt µg/g Gew.	%
	Morphin			
45 Aufn.	69000	100	9,08	100
2 Abg.	21000	30	3,08	29
	Kontrollen			
45 Aufn.	71000	100	9,87	100
2 Abg.	13000	18	1,87	19

Auch hier zeigt der ^{14}C-Gehalt im Gewebe ein ähnliches Verhalten wie das chemisch bestimmte Dopamin.

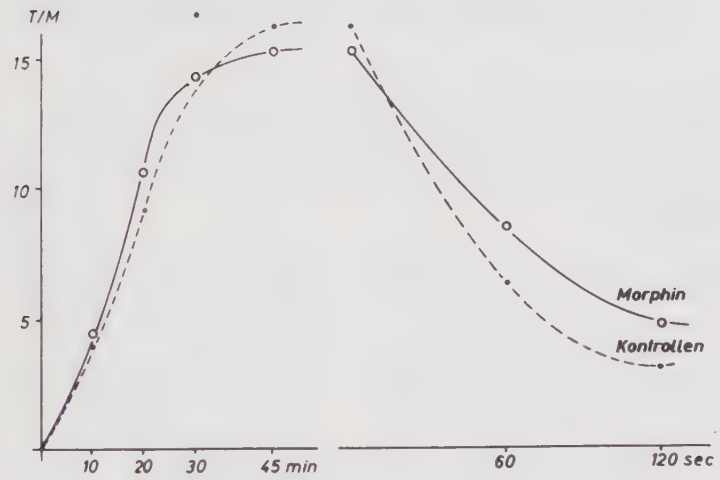


Abb. 6 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Morphin in vitro und Kontrollwerte

Bei der Aufnahme von ^{14}C-Dopamin unter Einwirkung von Morphin, läßt sich gegenüber den Kontrollwerten keine Veränderung im Kurvenverlauf erkennen. Morphin hat also keinen Einfluß auf die Aufnahme von Dopamin in die Schnitte des Gewebes.

Bei der Abgabe hingegen zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen den Kontrollwerten und den durch Morphin beeinflußten

Werten. Die K^+ stimulierte Abgabe wird durch Morphin signifikant verlangsamt, $p \leq 0{,}01$ nach 1 min. (Student's t-Test) [91].

c) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Amphetamin in vitro

Um die Wirkung von Amphetamin auf die Aufnahme und Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums in vitro zu untersuchen, wurde eine 5×10^{-5} molare Amphetaminlösung in vitro zugesetzt. Parallel hierzu wurden wieder Kontrollversuche ohne das Pharmakon vorgenommen.

Tab. 6 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Amphetamin in vitro

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Amphetamin	$s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 4 Kontrollen	$s_{\bar{x}}$
Aufnahme				
min.				
10	2,40	± 0,09	4,51	± 0,10
20	3,05	± 0,07	9,00	± 0,16
30	4,11	± 0,11	13,12	± 0,09
45	4,35	± 0,10	16,21	± 0,35
Abgabe				
sek.				
20	4,07	± 0,05	15,30	± 0,09
60	2,56	± 0,08	5,81	± 0,12
300	1,39	± 0,10	2,80	± 0,08

Unter Wirkung von Amphetamin zeigt sich, daß die Aufnahme von Dopamin geringer ist als in den Kontrollwerten.

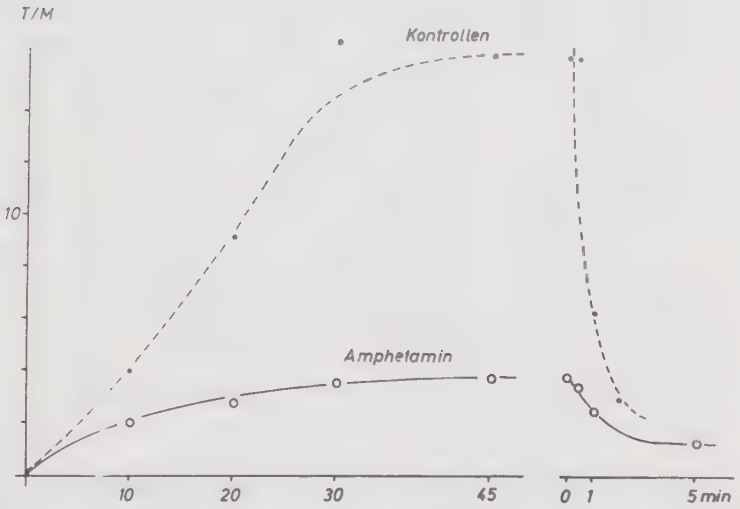


Abb. 7 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Amphetamin in vitro und Kontrollen

Bei der maximalen Aufnahmezeit von 45 Minuten hatten die durch Amphetamin beeinflußten Schnitte nur ein Viertel des Dopamins aufgenommen, das die Kontrollschnitte aufnahmen. Auch die Abgabe von Dopamin wird durch Amphetamin beeinflußt. Die Abgabe ist durch Amphetamin deutlich abgeschwächt worden. Man sieht dies besonders gut in der halb.-log. Darstellung der Abgabe (Abb. 11).
Der Vergleich des fluorometrisch bestimmten Dopamins mit dem gemessenen ^{14}C-Gehalt zeigt bei der Aufnahme von 45 Minuten und der Abgabe von 2 Minuten eine gute Parellelität.

Tab. 7 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einwirkung von Amphetamin in vitro (an Schnitten des Striatums)

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamin-gehalt µg/g Gew.	%
Amphetamin				
45 Aufn.	17000	100	2,76	10
2 Abg.	9000	53	1,30	5
Kontrollen				
45 Aufn.	51000	100	8,52	100
2 Abg.	11000	21	1,71	20

d) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Imipramin in vitro

Imipramin wurde in der Konzentration von 1×10^{-4} mol/l zum Aufnahme- und Abgabemedium zugegeben und seine Auswirkung auf die Aufnahme und Abgabe von ^{14}C-Dopamin an den Schnitten des Corpus striatum untersucht. Parallel hierzu wurden Kontrollmessungen ohne Imipramin durchgeführt.

Imipramin zeigt deutlich eine Wirkung auf die Aufnahme von Dopamin in die Gewebeschnitte. Die Aufnahme an Dopamin wird stark reduziert. Die Kontrollwerte liegen fast fünfmal so hoch. (Abb.8)

Die K^+ stimulierte Abgabe wird fast vollständig unterbunden siehe halb.-log. Darstellung (Abb. 11) .

Tab. 8 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einfluß von Imipramin in vitro (T/M = Gewebe/Medium Quotient)

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Imipramin	$s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Kontrollen	$s_{\bar{x}}$
	Aufnahme			
min.				
10	1,97	± 0,02	4,91	± 0,23
20	2,23	± 0,10	9,52	± 0,15
30	2,80	± 0,04	15,50	± 0,20
45	2,89	± 0,03	16,02	± 0,09
	Abgabe			
sek.				
20	2,77	± 0,03	16,00	± 0,21
60	2,63	± 0,02	6,30	± 0,02
120	2,74	± 0,04	3,22	± 0,11
300	2,23	± 0,05	3,10	± 0,23

Der Vergleich des absoluten Gehaltes an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe zeigt bei einer Aufnahmezeit von 45 Minuten und bei einer Abgabezeit von 2 Minuten wieder eine gute Parallelität.

Tab. 9 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einfluß von Imipramin in vitro

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamin-gehalt µg/g Gew.	%
	Imipramin			
45 Aufn.	10000	100	1,90	100
2 Abg.	7700	77	1,30	70

Zeit min.	dpm/1g Gewebe		Absol. Dopamin-gehalt µg/g Gew.	
Kontrollen				
45 Aufn.	67000	100	9,04	100
2 Abg.	13800	20	1,89	21

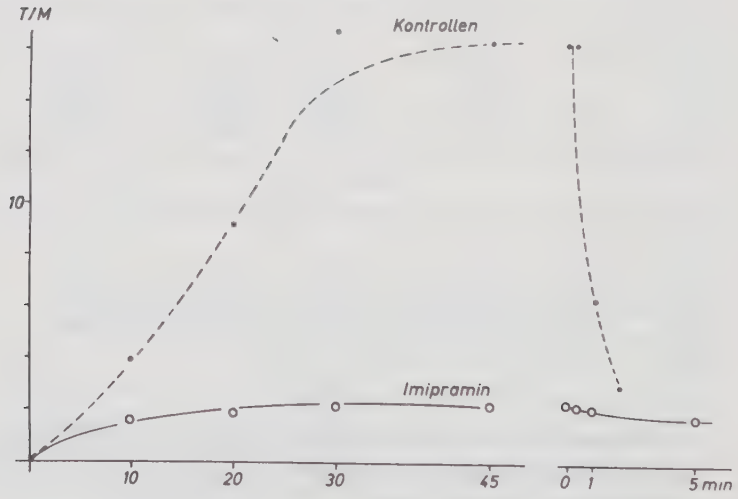


Abb. 8 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Imipramin in vitro und Kontrollwerte

e) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Äthanol in vitro

Äthanol wurde dem Aufnahme- und Abgabemedium so zugesetzt, daß eine 1‰ Lösung entstand ($1{,}7 \times 10^{-2}$ molar), um seine Wirkung auf die Aufnahme und Abgabe von Dopamin in die Schnitte des Striatums zu untersuchen. Parallel hierzu wurden Kontrollversuche ohne Zusatz von Äthanol vorgenommen, um Fehlerquellen auszuschließen.

Tab. 10 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Äthanol in vitro (T/M = Gewebe/Medium-Quotient)

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Äthanol	$s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Kontrollen	$s_{\bar{x}}$
	Aufnahme			
min.				
10	2,95	± 0,15	3,36	± 0,22
20	4,98	± 0,07	6,80	± 0,10
30	6,66	± 0,13	10,86	± 0,21
45	8,71	± 0,13	12,62	± 0,08
	Abgabe			
sek.				
20	3,40	± 0,03	11,58	± 0,06
60	2,76	± 0,09	4,51	± 0,10
120	1,94	± 0,10	2,68	± 0,11

Es zeigte sich eine Wirkung des Äthanols auf die Aufnahme von Dopamin in die Schnitte des Striatums. Nach 45 Minuten Aufnahmezeit liegt der Wert mit Äthanol etwa ein Drittel tiefer als der Kontrollwert, die Aufnahme wird gehemmt.

Bei den Abgabewerten mit Äthanol zeigte sich kein Unterschied zu den Abgabekontrollwerten. In der halb.-log. Darstellung der Abgabe sieht man es besonders deutlich (Abb. 11).

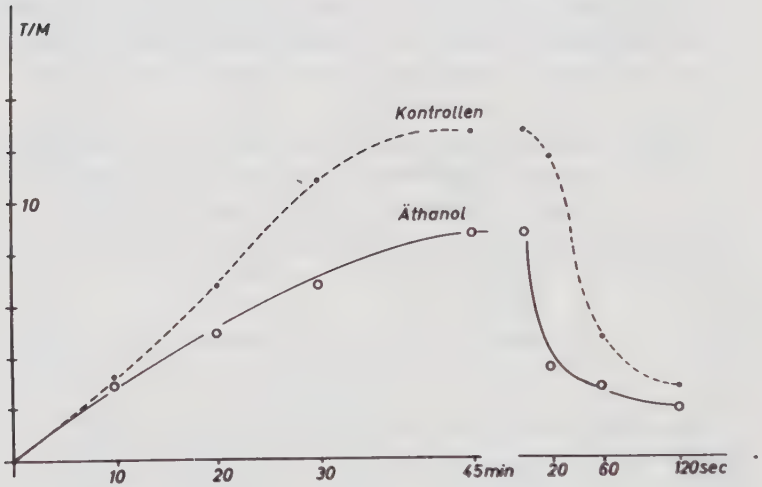


Abb. 9 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Äthanol in vitro und Kontrollwerte

Ein Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe zeigt bei einem Aufnahmewert von 45 Minuten und einer Abgabe von 2 Minuten gute Parallelität beider Parameter (Tab. 11).

Tab. 11 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einfluß von Äthanol in vitro

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamin-gehalt µg/g Geweb.	%
Äthanol				
45 Aufn.	38600	100	4,15	100
2 Abg.	8500	22	1,72	28
Kontrollen				
45 Aufn.	56000	100	8,95	100
2 Abg.	11800	21	1,88	21

f) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums und K^+ stimulierte Abgabe unter Einwirkung von Pentobarbital in vitro

Pentobarbital wurde dem Aufnahme- und Abgabemedium in einer Konzentration von 1×10^{-4} mol/l zugesetzt. Seine Wirkung auf die Aufnahme und Abgabe von Dopamin wurde untersucht. Kontrollschnitte wurden ohne Zusatz von Pentobarbital inkubiert.

Durch die Gabe von Pentobarbital wird sowohl die Aufnahme, als auch die Abgabe von Dopamin in die Gewebeschnitte des Striatums verringert und verlangsamt, halb.-log. sieht man die Verlangsamung der Abgabe noch besser (Abb. 11).

Tab. 12 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einfluß von Pentobarbital in vitro

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Pentobarbital	$s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Kontrollen	$s_{\bar{x}}$
	Aufnahme			
min.				
10	3,56	± 0,13	3,36	± 0,20
20	4,14	± 0,34	6,92	± 0,29
30	7,97	± 0,16	11,26	± 0,48
45	7,97	± 0,18	11,36	± 0,17
	Abgabe			
sek.				
20	5,94	± 0,28	9,86	± 0,32
60	4,74	± 0,15	6,67	± 0,09
120	4,03	± 0,07	3,19	± 0,12

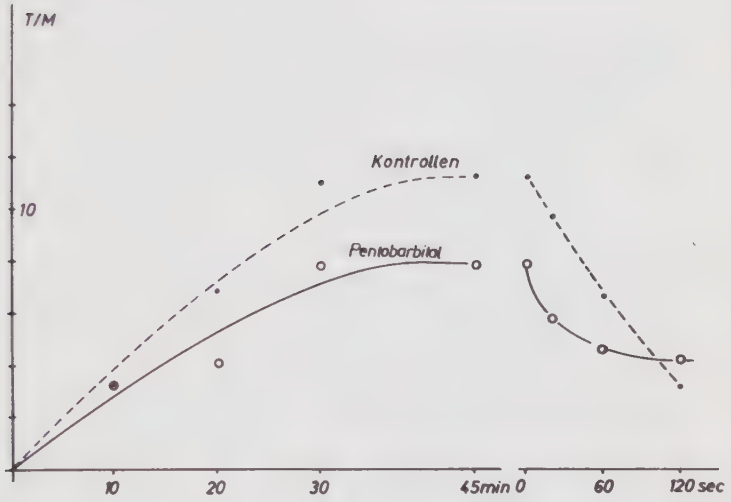


Abb. 10 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums unter Einwirkung von Pentobarbital in vitro und Kontrollwerte

Tab. 13 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe unter Einfluß von Pentobarbital in vitro

Zeit min.	dpm/g Gewebe	%	Absol. Dopamingehalt µg/g Gewb.	%
Pentobarbital				
45 Aufn.	35000	100	5,26	100
2 Abg.	17500	50	2,63	44
Kontrollen				
45 Aufn.	51000	100	8,46	100
2 Abg.	12000	23	2,20	26

Der Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt des Gewebes zeigte bei beiden Zeiten eine gute Parallelität.

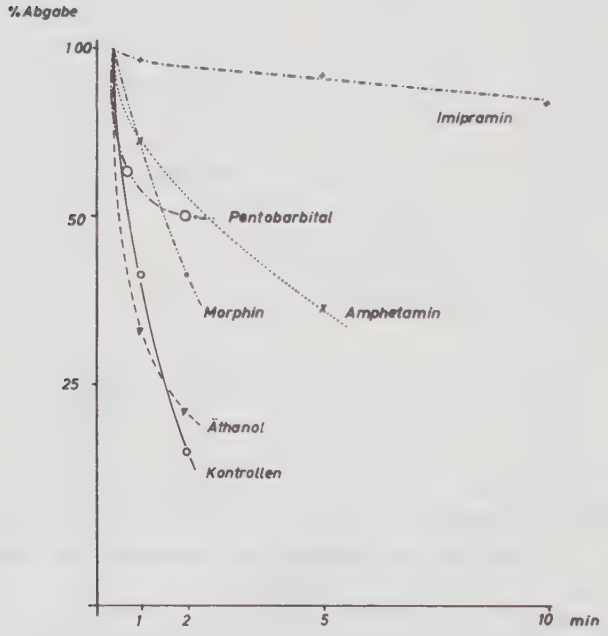


Abb. 11 Abgabe von ^{14}C-Dopamin halb.-log., neutral und unter Einwirkung von Pharmaka (Morphin, Amphetamin, Imipramin, Äthanol, Pentobarbital), in vitro

Es wurde der Einfluß von Morphin in vitro auf die Aufnahme und Abgabe von Dopamin in die Gewebeschnitte des Striatums untersucht.

Die Wirkung des Morphins wurde mit dem Einfluß anderer Pharmaka auf die Aufnahme und Abgabe verglichen.

Morphin zeigte im Gegensatz zu Amphetamin, Imipramin, Pentobarbital und Äthanol keinerlei Wirkung auf die Aufnahme von Dopamin in vitro. Die anderen vorher genannten vier Pharmaka zeigten alle eine mehr oder weniger starke Hemmung der Aufnahme von Dopamin in die Gewebeschnitte. Die Stärke der Hemmung bei der Aufnahme stieg vom Pentobarbital, Äthanol, Amphetamin, Imipramin hin an.

Die Abgabe von Dopamin aus den Gewebeschnitten wird durch Morphin gehemmt. Auch Imipramin und Amphetamin bremsten die Abgabe des Dopamins aus den Schnitten. Pentobarbital beeinflußte Schnitte gaben in der ersten Minute, wie die Kontrollschnitte, Dopamin ab, dann trat eine Verlangsamung der Abgabe ein. Äthanol zeigte keinerlei Wirkung auf K^+ stimulierte Abgabe des Dopamins.

Daraus läßt sich schließen, daß Morphin auf zellulärer Ebene ein generell anderes Verhaltensmuster zeigt, als die vier anderen Substanzen. Jede Substanz zeigte ein individuelles Spektrum für die Aufnahme und Abgabe von Dopamin in vorliegenden Präparaten.

Ob und in wie weit die Wirkung von Morphin, das einmal oder chronisch Ratten verabreicht wurde, sich auf die in vitro Aufnahme von Dopamin auswirkt, soll im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden.

4. Versuche an Schnitten Morphin-behandelter Ratten

a) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von akut mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe

40 Minuten vor der Dekapitation wurde Ratten 20 mg/kg Morphinlösung intraperitonal injiziert. Für die Kontrollwerte wurde die gleiche Flüssigkeitsmenge an 0,9% Kochsalzlösung verwandt. In die Schnitte dieser Ratten wurde ^{14}C-Dopamin aufgenommen und die K^+ stimulierte Abgabe durchgeführt.

Tab. 14 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 40 min. nach akuter Gabe von 20 mg/kg Morphin

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin $s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Na Cl - Kontrollen $s_{\bar{x}}$
	Aufnahme	
min. 45	12,49 ± 0,17	12,97 ± 0,12
	Abgabe	
sek. 20	9,18 ± 0,22	8,97 ± 0,46
60	6,49 ± 0,26	5,62 ± 0,51
120	4,00 ± 0,10	3,51 ± 0,07

Die Aufnahme von Dopamin in die Schnitte des Striatums wurde durch akute Vorbehandlung mit Morphin in vivo nicht beeinflußt. Dies war deutlich an dem 45 min.-Aufnahmewert zu sehen, der für die akuten und die Kontrollwerte gleich ist. Die Abgabewerte an den Schnitten

der Striata, die vorher akut mit Morphin vorbehandelt wurden, zeigen eine Verlangsamung der Abgabe, verglichen mit den Kontrollwerten. Die Verlangsamung der Abgabe ist aber nicht so ausgeprägt wie bei der Zugabe von Morphin in vitro:

	Mittelwert T/M in vitro Morphin	$s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M in vivo, akut Morphin	$s_{\bar{x}}$
60 sek. Abgabe	8,50 ±	0,38	6,49 ±	0,26
	Kontrollwerte		Na Cl-Kontrollen	
	6,10 ±	0,65	5,62 ±	0,21

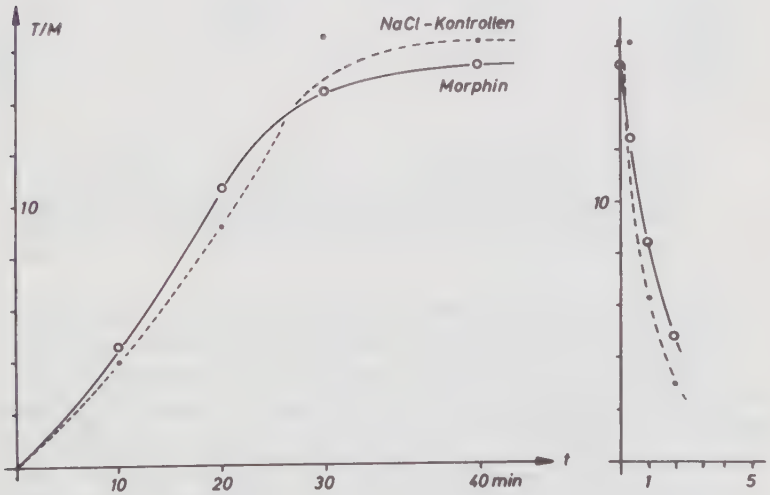


Abb. 12 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von akut mit Morphin behandelten Ratten und Kontrollwerte

Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe zeigte bei beiden Zeiten eine gute Übereinstimmung.

Tab. 15 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums nach akuter Gabe von Morphin

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamin-gehalt µg/g Gewebe	%
Morphin				
45 Aufn.	57000	100	9,12	100
2 Abg.	18000	31	3,05	33
Kontrollen				
45 Aufn.	56000	100	9,05	100
2 Abg.	12000	21	2,27	25

b) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe (40 min. nach der letzten Injektion)

Die Schnitte der Striata der chronisch mit Morphin vorbehandelten Ratten wurden mit ^{14}C-Dopamin inkubiert und anschließend die K^+ stimulierte Abgabe gemessen. Parallel hierzu wurden Kontrollversuche mit Schnitten Kochsalzlösung-behandelter Ratten durchgeführt.

Die Aufnahme von ^{14}C-Dopamin verlief unter chronischer Gabe von Morphin wie unter akuter Gabe ab. Es zeigten sich keine Veränderungen. Bei K^+ stimulierter Abgabe von ^{14}C-Dopamin fand man die gleiche Verlangsamung der Abgabe von Dopamin gegenüber den Kontroll-

werten, wie sie aus akuten Versuchen schon bekannt war.

Tab. 16 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 40 Minuten nach der letzten chronischen Gabe von Morphin

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin $s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Na Cl-Kontrollen $s_{\bar{x}}$
	Aufnahme	
min. 45	12,95 ± 0,17	12,75 ± 0,34
	Abgabe	
sek. 20	9,62 ± 0,13	7,89 ± 0,17
60	6,44 ± 0,12	5,17 ± 0,13
120	5,03 ± 0,10	3,60 ± 0,22

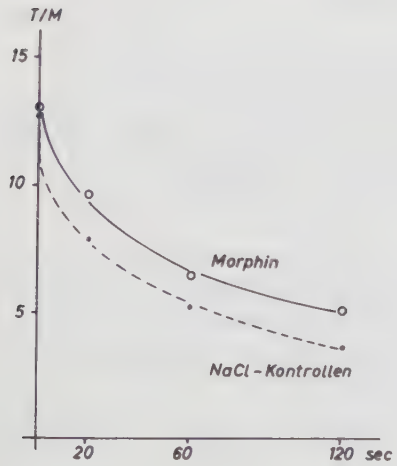


Abb. 13
Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (40 min. nach der letzten Injektion) und Kontrollen

Der Vergleich des durch Szintillationsmessung erhaltenen ^{14}C-Gehalts im Gewebe und des fluorometrisch bestimmten absoluten Gehalts an Dopamin, zeigte gute Parallelität.

Tab. 17 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums nach chronischer Gabe von Morphin (40 min. nach der letzten Injektion)

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamingehalt µg/g Gewb.	%
Morphin				
45 Aufn.	57000	100	9,30	100
2 Abg.	22500	39	2,85	36
Kontrollen				
45 Aufn.	56000	100	9,20	100
2 Abg.	14000	24	2,30	25

c) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe (18 Std. nach der letzten Injektion)

Ratten wurden chronisch mit Morphin behandelt, 18 Stunden vor der Dekapitation erhielten sie die letzte Injektion. Parallel hierzu wurde mit Ratten verfahren, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden. Die Schnitte der Striata der so vorbehandelten Ratten wurden mit ^{14}C-Dopamin inkubiert und die K^+ stimulierte Abgabe des Dopamins zeitlich verfolgt.

Die Aufnahme von Dopamin wurde durch die chronische Gabe von Morphin und den Entzug nicht beeinträchtigt. Bei der K^+ stimulierten Abgabe zeigte sich wie bei der Gabe von Morphin in vitro eine Verlangsamung der Abgabe an Dopamin gegenüber den Kontrollwerten.

Auch jetzt wird die Dopaminabgabe offenbar durch noch vorhandenes Morphin an den Rezeptoren gehemmt.

Tab. 18 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin, gemessen an Schnitten des Striatums, 18 Std. nach der letzten chronischen Injektion von Morphin

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin	$s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Na Cl-Kontrollen	$s_{\bar{x}}$
	Aufnahme			
min.				
20	6,60	± 0,07	6,14	± 0,16
45	11,56	± 0,27	12,41	± 0,38
	Abgabe			
sek.				
40	8,00	± 0,37	5,58	± 0,24
60	5,91	± 0,40	4,47	± 0,32
120	2,91	± 0,22	2,76	± 0,32

Tab. 19 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums (18 Std. nach der letzten chronischen Gabe von Morphin)

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamingehalt µg/g Gewebe	%
	Morphin			
45 Aufn.	53000	100	9,04	100
2 Abg.	14500	27	2,21	25
	Kontrollen			
45 Aufn.	55000	100	9,15	100
2 Abg.	12000	21	1,83	20

Auch hier wurde die Dopaminmenge chemisch bestimmt und mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe verglichen. Es zeigte sich eine gute Parallelität (Tab. 19).

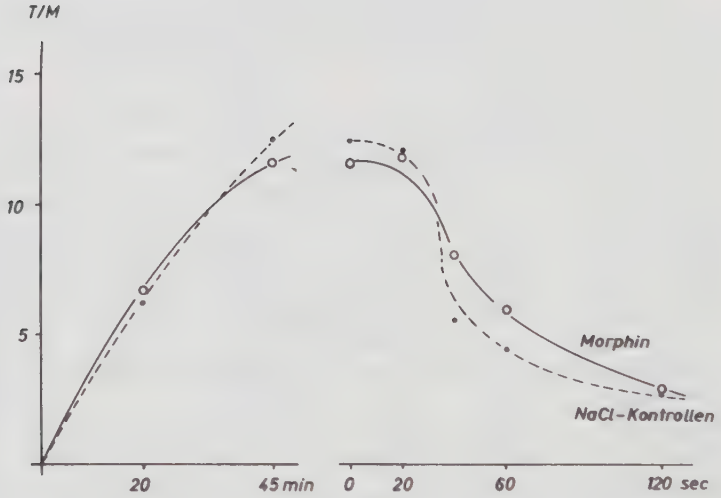


Abb. 14 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (18 Std. nach der letzten Injektion) und Kontrollen

d) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und K^+ stimulierte Abgabe (43 Std. nach der letzten Injektion)

Chronisch mit Morphin behandelte Ratten wurden 43 Stunden nach der letzten Injektion dekapitiert. Den mit Kochsalz behandelten Kontrollratten wurden parallel hierzu das Kochsalz entzogen. Die Schnitte der Striata dieser Ratten wurden mit ^{14}C-Dopamin inkubiert und anschließend die K^+ stimulierte Abgabe gemessen.

Tab. 20 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin gemessen an Schnitten des Striatums, (43 Std. nach der letzten chronischen Injektion).

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin $s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Na Cl-Kontrollen $s_{\bar{x}}$
	Aufnahme	
min. 45	11,98 ± 0,12	12,20 ± 0,17
	Abgabe	
sek. 20	7,87 ± 0,11	11,27 ± 0,12
40	4,40 ± 0,13	5,74 ± 0,20
90	2,46 ± 0,12	3,67 ± 0,29

Die Aufnahme von Dopamin in die Schnitte des Striatums bleibt nach 43stündigen Entzug des Morphins unverändert. Bei der Abgabe zeigt sich deutlich die Änderung. Die Abgabe des Dopamins ist bei den Tieren, denen 43 Stunden Morphin entzogen wurde, beschleunigt. Die Kontrollwerte liegen höher. Dies steht im Gegensatz zu den Abgabewerten nach kürzeren Entzugszeiten.

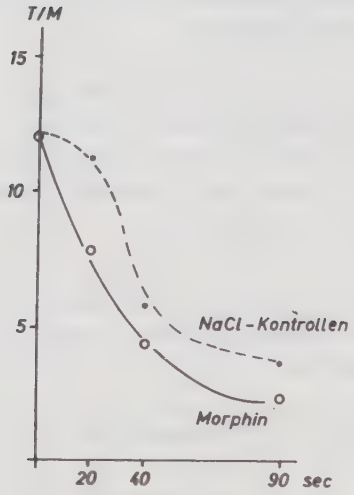


Abb. 15
Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (43 Std. nach der letzten Injektion) und Kontrollwerte

Die Dopaminmenge wurde fluorometrisch bestimmt und mit dem durch Szintillationszählung ermittelten ^{14}C-Gehalt verglichen. Zwischen beiden zeigte sich eine gute Parallelität.

Tab. 21 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums (43 Std. nach der letzten chronischen Gabe von Morphin)

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamingehalt µg/g Gewb.	%
Morphin				
45 Aufn.	53500	100	9,59	100
1 1/2 Abg.	10300	19	1,94	21
Kontrollen				
45 Aufn.	52500	100	9,09	100
1 1/2 Abg.	15500	29	2,27	30

e) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten, denen Naloxon in vivo verabreicht worden war.

Nach chronischer Behandlung mit Morphin erhielten die Ratten 40 Minuten vor der Dekapitation die letzte Morphininjektion. 10 Minuten vor der Dekapitation wurden 2 mg/kg Naloxon injiziert, um mittels dieses Antagonisten Morphin von den Rezeptoren zu verdrängen und somit einen raschen Entzug hervorzurufen. Auch die mit Kochsalz behandelten Kontrollratten erhielten 10 Minuten vor der Dekapitation Naloxon. In vitro wurde wiederum die Aufnahme und Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums untersucht.

Tab. 22 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten unter Gabe von Naloxon in vivo

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin $s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 5 Na Cl-Kontrollen $s_{\bar{x}}$
	Aufnahme	
min.		
20	9,03 ± 0,17	9,11 ± 0,20
45	13,90 ± 0,14	13,80 ± 0,12
	Abgabe	
sek.		
20	7,54 ± 0,09	10,72 ± 0,12
60	4,25 ± 0,20	7,03 ± 0,12
120	2,95 ± 0,14	3,70 ± 0,10

Morphin hatte in Verbindung mit Naloxon keine Wirkung auf die Aufnahme von Dopamin in die Schnitte des Striatums. Auch auf die mit Kochsalz behandelten Ratten zeigte Naloxon keinerlei Einfluß.

Bei den Abgabewerten zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Ratten, die mit Morphin und Naloxon behandelt wurden und denen, die Kochsalzlösung und Naloxon injiziert bekamen. Die Schnitte des Striatums der Ratten, die Morphin und Naloxon erhielten, gaben ^{14}C-Dopamin schneller in das umgebende Medium ab.

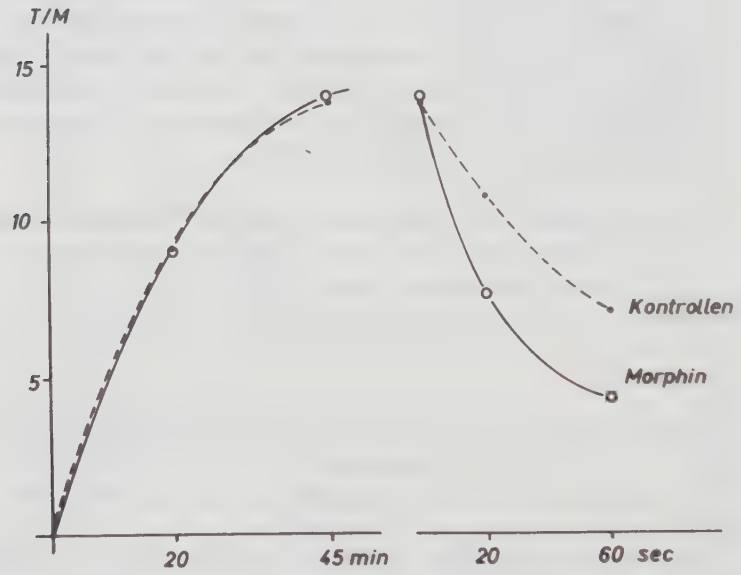


Abb. 16 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten unter Zugabe von Naloxon in vivo und Kontrollwerte

Vergleicht man wieder den durch Szintillationszählung erhaltenen ^{14}C-Wert mit dem durch Fluorometrie ermittelten Dopaminwert, so zeigt sich ein paralleles Verhalten.

Tab. 23 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit dem ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten und zusätzlicher Gabe von Naloxon in vivo

Zeit min.	dpm/1g Gewebe	%	Absol. Dopamin-gehalt µg/g Gewebe	%
Morphin				
45 Aufn.	61000	100	9,33	100
2 Abg.	12000	19	1,94	20
Kontrollen				
45 Aufn.	60000	100	9,20	100
2 Abg.	16500	27	2,39	26

f) Aufnahme von ^{14}C-Dopamin in die Schnitte des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten (40 min. nach der letzten Injektion) und Zugabe von Naloxon in vitro

Nach chronischer Behandlung der Ratten mit Morphin wurden sie 30 Minuten nach der letzten Injektion dekapitiert. Die mit Kochsalz behandelten Ratten wurden auch 30 Minuten nach ihrer letzten Injektion dekapitiert. Der Inkubationslösung für die Aufnahme und Abgabe von ^{14}C-Dopamin wurde je $3,5 \times 10^{-5}$ mol/l Naloxonhydrochlorid (Naloxon) zugesetzt.

Naloxon in vitro zugesetzt hatte keinerlei Wirkung auf die Aufnahme von Dopamin in die Gewebeschnitte des Striatums von chronischen Morphinratten. Auch die mit Kochsalzlösung behandelten Ratten zeigten keine Wirkung auf die Zugabe von Naloxon.

Nach 45 Minuten hatten wir bei beiden Gruppen das gleiche Aufnahmeniveau. Bei der K^+ stimulierten Abgabe des Dopamins zeigte Naloxon offenbar eine geringe Wirkung auf die Schnitte, die vorher

mit Morphin chronisch behandelt wurden. Die Abgabe des Dopamins scheint leicht beschleunigt gegenüber den Kontrollwerten.

Tab. 24 Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums nach chronischer Morphinbehandlung der Ratten und Zusatz von Naloxon in vitro (T/M = Gewebe-Medium-Quotient)

Zeit	Mittelwert T/M n = 6 Morphin $s_{\bar{x}}$	Mittelwert T/M n = 6 Na Cl-Kontrollen $s_{\bar{x}}$
	Aufnahme	
min. 45	13,12 ± 0,95	13,07 ± 0,58
	Abgabe	
sek.		
20	9,12 ± 0,52	9,72 ± 0,22
60	7,44 ± 0,42	7,96 ± 0,48
120	6,01 ± 0,82	6,84 ± 0,45

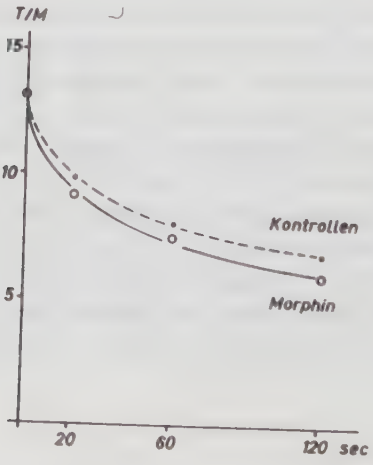


Abb. 17
Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Striatums von chronisch mit Morphin behandelten Ratten unter Zugabe von Naloxon in vitro und Kontrollwerte

Vergleicht man den durch Szintillationsmessung ermittelten ^{14}C-Wert mit der absoluten Menge an Dopamin, der fluorometrisch bestimmt wurde, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung.

Tab. 25 Vergleich des absoluten Gehalts an Dopamin mit den ^{14}C-Gehalt im Gewebe an Schnitten des Striatums chronischer Morphinratten (Zusatz von Naloxon in vitro)

Zeit min.	dpm/g Gewebe	%	Absol. Dopamingehalt µg/g Gewb.	%
Morphin				
45 Aufn.	55000	100	9,08	100
2 Abg.	12000	21	3,07	19
Kontrollen				
45 Aufn.	55000	100	9,12	100
2 Abg.	16000	28	3,37	26

IV. Diskussion

Die Funktion einer dopaminergen Nervenendigung stellt man sich wie folgt vor .

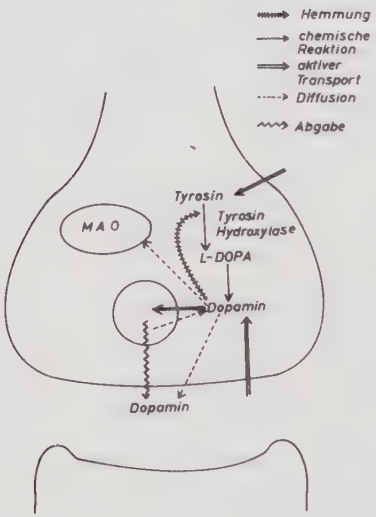


Abb. 18 Schema einer dopaminergen Nervenendigung

Tyrosin (α-Amino-β-phenyl-propionsäure) wird in die Nervenzelle aufgenommen, daraus mit Hilfe der Tyrosinhydroxylase L-Dopa (L-3,4 -Dihydroxyphenylalanin) gebildet. L-Dopa wird durch Dopadecarboxylase zu Dopamin (3,4-Dihydroxyphenyläthylamin) umgewandelt. Beides sind enzymatisch gesteuerte chemische Reaktionen (s.a.Abb.1). Dopamin liegt jetzt in freier Form im Cytoplasma der Synapse vor. Für das Dopamin gibt es von dieser Stelle verschiedene Arten des Weitertransports. Der größte Teil des Dopamins wird durch einen

aktiven Transport in die Granula gebracht und dort gespeichert. Ein kleiner Teil diffundiert in die Mitchondrien, wo Dopamin durch Monoaminooxydase abgebaut wird, ein anderer sehr geringer Teil diffundiert durch die Membran in den synaptischen Spalt. Die Granula geben bei Depolarisation der Zellmembran in den synaptischen Spalt Dopamin ab, das mit dem an der nachfolgenden Nervenzelle gelegenen Rezeptor sehr schnell reagiert. Die Bindung des Dopamins an den postsynaptischen Rezeptor bewirkt Veränderungen der Membraneigenschaften der zugehörigen Nervenzelle. Dopamin im synaptischen Spalt wird sodann wieder in die Nervenendigung durch einen aktiven Mechamismus transportiert und zwar zunächst ins Cytoplasma. Hier beginnt der Kreislauf von vorne [3,6,8,73,89]. Diese aktive Wiederaufnahme beendet auch die Wirkung des Dopamins an den Rezeptoren. Jedes Dopaminmolekül wird also in der Regel mehrmals verwendet. Die Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin an Schnitten des Corpus striatum der Ratte wurde vorgenommen, um mögliche Veränderungen in einem oder mehreren dieser Einzelprozesse zu ermitteln.

Die vier Pharmaka, die mit Morphin in ihrer Wirkung auf die Aufnahme und Abgabe von Dopamin in und von Schnitten des Striatums verglichen wurden, zeigten jeweils ein ganz spezifisches Aufnahme- und Abgabespektrum [28].

Es ist bekannt, daß Imipramin die Wiederaufnahme von Katecholaminen durch die Zellmembran blockiert [37]. Dies wurde durch meine Befunde bestätigt. Außerdem hemmt Imipramin unter diesen speziellen Bedingungen, d.h. an striatalen Schnitten, offensichtlich die Abgabe an Dopamin durch die Zellmembran in vitro.

Ein ähnliches Verhalten zeigt das Amphetamin. Glowinski [30] konnte an Hand von in vivo Versuchen zeigen, daß bei der Ratte Amphetamin, in höheren Dosen gegeben, die Wiederaufnahme von Katecholaminen durch die Zellmembran in die Synapse blockiert. Meine in vitro Versuche bestätigen diesen experimentellen Befund. Diese Messungen zeigten andererseits bei der K^+ stimulierten Abgabe nur eine relativ geringe Abschwächung der Dopaminfreisetzung.

Pentobarbital zeigte nach diesen Untersuchungen sowohl eine leichte Hemmung der Aufnahme, als auch der Abgabe an Dopamin. Auch in vivo haben Barbiturate offensichtlich einige Wirkungen auf den Dopaminstoffwechsel im Gehirn: Sie können unter bestimmten Bedingungen den Dopaminstoffwechsel im Corpus striatum hemmen [41,42].

Auch Äthanol wirkt auf die Aufnahme von Dopamin in die Schnitte des Corpus striatum hemmend. Die Abgabe bleibt unbeeinflußt. Diese Befunde können in Zusammenhang stehen mit Beobachtungen von Carlsson et al. an Mäusen und Ratten in vivo, die auf eine Aktivierung dopaminerger und noradrenerger Mechanismen durch Äthanol hinweist [39,40].

Keines der oben beschriebenen Pharmaka zeigt Übereinstimmung mit dem Aufnahme- und Abgabespektrum des Morphins. Morphin bewirkt weder nach Applikation in vivo noch nach Zusatz zum Inkubationsmedium in vitro eine Änderung in der Dopaminaufnahme. Die K^+ stimulierte Abgabe hingegen wurde durch in vivo verabreichtes Morphin wie auch in vitro zugefügtes gegenüber den Kontrollwerten gehemmt [28]. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um keine direkte "mechanische" Freisetzungshemmung des Dopamins durch Morphin; denn wäre dies der Fall, so hätte der Abbau zur Homovanillinsäure, deren einer Schritt, die -O- Methylierung, vorwiegend extrazellulär erfolgt, vermindert sein müssen. Das Gegenteil trifft zu [12]. Alle diese experimentellen Befunde lassen sich vielleicht durch den folgenden hypothetischen Wirkungsmechanismus des Morphins innerhalb einer dopaminergen Synapse erklären.

Normalerweise wird das neu gebildete Dopamin in den Granula gespeichert und die gespeicherte Substanz bei Bedarf, d.h. nach Depolarisation in den synaptischen Spalt freigesetzt, wo es mit dem postsynaptischen Dopaminrezeptor reagiert und somit ein Signal von einer Nervenzelle zur nachfolgenden weiter gibt. Durch die Einwirkung des Morphins kommt es zu einer Fehlsteuerung des neu synthetisierten Dopamins in der Synapse. Dopamin wandert nicht in die Granula sondern in die Mitchondrien. Dort findet normaler-

weise nur der Abbau des überflüssigen extragranulären Dopamins mit Hilfe von Monoaminooxydase statt. Dopamin ist also im falschen Kompartiment und steht nicht zur Freisetzung aus den Granula zur Verfügung, so daß die Dopaminrezeptoren nicht genügend Dopamin erhalten. Um diesen Mangelzustand zu kompensieren, wird vermehrt Dopamin synthetisiert, ein Kompensationsmechanismus, der von vielen katecholaminergen Neuronen her gut bekannt ist [75].
Bei in vitro Versuchen ist die Aufnahme und Speicherung von Dopamin gegenüber den Kontrollversuchen nicht merklich verändert. Ist aber Dopamin im "falschen Speicher", so müßte daraus eine Verringerung der durch Membrandepolarisation hervorgerufenen Abgabe resultieren. Hierhin deuten die eigenen Befunde, nämlich die Hemmung der K^+ stimulierten Abgabe von Dopamin, da durch K^+ induzierte Depolarisation die in den Granula gespeicherten Katecholamine sehr selektiv ausgeschüttet werden, nicht aber in anderen Kompartimenten in der Nervenendigung befindliches Dopamin.

Morphin ist offenbar in der Lage, an den dopaminergen Neuronen, die von der Substantia nigra zum Corpus striatum führen, in der Nähe der Synapse anzugreifen, da in vitro ein Effekt des Morphins auf die Schnitte des Striatums beobachet wurde. Das ist in guter Übereinstimmung mit den in vivo Symptomen, wie Abnahme der spontanen Motorik, Katalepsie ect. (s.S. 4), die auf eine verminderte dopaminerge Übertragung hinweisen: Die in vitro Versuche zeigten also ebenfalls eine Hemmung der Dopaminfreisetzung.

Nach wiederholter Morphingabe hingegen treten mehr und mehr Symptome auf, die auf eine Aktivierung dopaminerger Mechanismen hinweisen (Nageaktivität, erhöhte lokomotorische Aktivität etc.) [44,48]. Welche theoretischen Erklärungen gibt es hierfür und wie lassen sich diese mit den Befunden vereinbaren.

Die eine Theorie geht davon aus, daß das unterschiedliche Verhalten der Ratten nach chronischer und akuter Gabe auf einer postsynaptischen Veränderung infolge der chronischen Morphingabe

beruht. Wird einer Ratte einmalig Morphin gegeben, so kommt es zu einer verminderten Freisetzung an Dopamin. Bei mehrmaliger Gabe von Morphin hat dies zur Folge, daß die postsynaptischen Dopaminrezeptoren, um den Mangel an Dopamin auszugleichen, überempfindlich reagieren, ein Mechanismus, der prinzipiell bei katecholaminergen Neuronen auftreten kann [46].

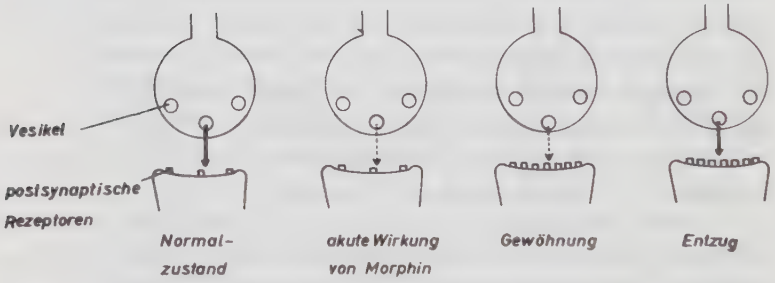


Abb. 19 Darstellung der postsynaptischen Überempfindlichkeit

Entzieht man jetzt den chronisch behandelten Tieren das Morphin, so wird die normale Menge an Transmitter wieder freigesetzt. Die postsynaptischen Rezeptoren reagieren aber gegenüber dem freigesetzten Transmitter Dopamin noch überempfindlich. Es kommt zu einer Hyperaktivierung der Tiere. Wäre dies in unserem System der Fall gewesen, so hätte die postsynaptische, durch Dopamin stimulierte Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat im Homogenat der Striata von solchen Ratten gesteigert sein müssen [45]. Diese Möglichkeit konnte aber ausgeschlossen werden: An diesem System zeigt sich kein vermehrter Anstieg des cyclischen AMP

infolge Dopamin im Homogenat Morphin-abhängiger Ratten [90]. Hätte eine Überempfindlichkeit vorgelegen, so hätte sie in diesem System nachweisbar sein müssen, da Mishra et. al. eine deutliche Steigerung der Dopamin-induzierten Synthese des cycl. AMP im Homogenat von Ratten, deren dopaminerge Afferenzen zerstört waren und die eine typische Überempfindlichkeit postsynaptischer Rezeptoren entwickelt hatten, fanden [88]. Es liegt also offensichtlich keine Überempfindlichkeit der postsynaptischen Rezeptoren im Entzug vor.

Unsere Ergebnisse nach chronischer Gabe von Morphin lassen vielmehr darauf schließen, daß chronische Verabreichung von Morphin zu Veränderungen in der Abgabe des Dopamins aus den dopaminergen Neuronen im Striatum führt. Der Effekt nach chronischer Gabe ist dem nach akuter Gabe entgegengerichtet. Bei dieser Änderung scheint es sich um einen Anpassungsprozess der dopaminergen Neurone zu handeln. Diese Änderung ist nur im Entzug zu untersuchen, wenn Morphin von den Rezeptoren dissoziiert ist oder durch Naloxon, einem Derivat des Morphins, verdrängt worden ist [28,74].

Bei in vivo Versuchen war der Entzug des Morphins nach chronischer Gabe mit einem Anstieg an Dopamin im Striatum verbunden, wie Iwamoto et. al. fanden [74]. Bei den eigenen in vitro Versuchen zeigte sich bei der Aufnahme kein Anstieg des Dopamins gegenüber den Kontrollen, es zeigte sich aber eine Veränderung bei der K^+ stimulierten Abgabe unter Morphin und anschließendem Entzug. Folgende Tendenz zeigte sich klar: Nach chronischer Gabe von Morphin, war die Abgabe kurz nach der letzten Morphinverabreichung gehemmt. Nach 18 stündigem Entzug zeigte sich noch eine leichte Hemmung der Abgabe, verglichen mit den Kontrollwerten. Wurde Morphin jedoch 43 Stunden lang entzogen, so ist nun die K^+ stimulierte Abgabe von Dopamin gegenüber den Kontrollen beschleunigt. Offenbar sind erst nach dieser Zeit die letzten Morphin-Moleküle von den zugehörigen Rezeptoren im Gehirn dissoziiert.

Nach präzipitierten Entzug durch den kompetitiven Antagonisten Naloxon, wurde ebenfalls eine sogar noch deutlicher ausgeprägte

Vermehrung der Dopaminabgabe gegenüber den Kontrollen gefunden.

Auch bei Zugabe von Naloxon in vitro zeigte sich eine vermehrte Abgabe des Dopamins an Geweben Morphin-gewöhnter Ratten. Dies ist aber nicht so ausgeprägt, wie bei den beiden vorher genannten Versuchen.

Ähnliche Befunde erhielt Montel et. al. an Schnitten des Cortex der Ratte: Wird nach chronischer Gabe von Morphin nun das Morphin entzogen, so ist der durch elektrische Stimulation des Gewebes (die ebenfalls Depolarisation hervorruft) induzierte Abgabe von vorher aufgenommenen Noradrenalin gegenüber den Kontrollen vermehrt [75,76].

Offensichtlich wird der erste Effekt, der nach akuter Gabe von Morphin eintritt und die Abgabe des Transmitters hemmt, durch einen zweiten Effekt nach chronischer Gabe, der dem ersten entgegengesetzt ist, abgelöst. Dieser Effekt ruft eine Beschleunigung der Abgabe an Dopamin hervor und spiegelt offenbar einen zellulären Kompensationsmechanismus wieder [77,78,79,80].

Diese Veränderung in der Abgabe des Transmitters steht in guter Übereinstimmung mit der Hypothese von Kosterlitz und Hughes: Vor kurzem wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen im Zentralnervensystem eine körpereigene Substanz gefunden, die spezifisch mit dem Opiatrezeptor reagiert. Hierbei handelt es sich um zwei kleine Peptide zu je fünf Aminosäuren (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH und H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH). Diese Substanz wurde von Kosterlitz und Hughes Enkephalin genannt [49,92,93]. An verschiedenen in-vitro-Systemen wurde gezeigt, daß es als Inhibitor auf die Transmitterabgabe wirkt. Läßt man jetzt eine opiatähnliche Substanz auf die Neurone einwirken, so wandert diese auch an den Opiatrezeptor und verstärkt somit die inhibitorische Wirkung auf die Transmitterfreisetzung. Bei chronischer Behandlung mit einem Opiat wird weniger Enkephalin synthetisiert und das Opiat tritt an seine Stelle. Es kommt wieder zur normalen Abgabe an Transmitter, wobei das Opiat die inhibitorische Kontrolle des Transmitters übernimmt. Entzieht man nun das Opiat

und unterbricht somit die inhibitorische Wirkung, dann kommt es zur verstärkten Abgabe an Transmitter. Diese Wirkung muß so lange anhalten, bis sich genügend Enkephalin nachgebildet hat, um die inhibitorische Kontrolle wieder voll zu übernehmen.

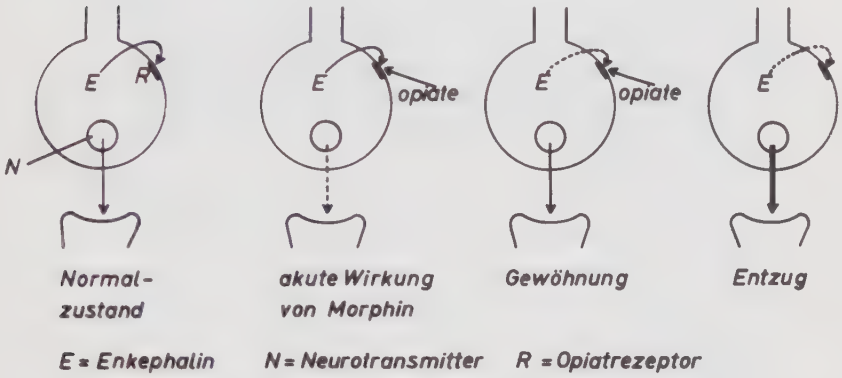


Abb. 20 Präsynaptischer Wirkungsmechanismus von Opiaten nach der Hypothese von Kosterlitz und Hughes

Die Veränderungen, die bei akuter und chronischer Gabe von Morphin im Transmitterhaushalt der Synapse vorgehen, scheinen auch für das Auftreten einiger Entzugsymptome von Bedeutung zu sein. Die durchgeführten in vivo Versuche mit Morphin stimmen gut überein mit in vitro Versuchen. Beide scheinen das gleiche Phänomen zu beschreiben.

V. Zusammenfassung

Beim Vergleich der Wirkung von Morphin auf die Schnitte des Corpus striatum von Ratten in vitro mit anderen Pharmaka, zeigte sich, daß Morphin die Aufnahme und die K^+ stimulierte Abgabe von ^{14}C-Dopamin ganz charakteristisch verändert. Keine der Vergleichssubstanzen Amphetamin, Imipramin, Pentobarbital und Äthanol entsprach im Aufnahme- und Abgabespektrum dem Morphin.

1) Amphetamin hemmte deutlich die Dopaminaufnahme und auch die Abgabe an Dopamin war gegenüber den Kontrollwerten um die Hälfte verlangsamt.
2) Imipramin hatte einen noch stärker hemmenden Effekt auf die Aufnahme von Dopamin als Amphetamin. Die K^+ stimulierte Abgabe des Dopamins wurde fast vollständig unterbunden.
3) Äthanol zeigte nur eine dämpfende Wirkung auf die Aufnahme von Dopamin in die Gewebeschnitte. Die Abgabe des Dopamins blieb unbeeinflußt.
4) Pentobarbital wirkte sich gegenüber den Kontrollwerten leicht hemmend auf die Aufnahme und K^+ stimulierte Abgabe von Dopamin aus.
5) Nach akuter Gabe von Morphin wurde zwar keine Beeinflussung der Aufnahme, aber eine Verlangsamung der Dopaminabgabe gefunden. Nach chronischer Gabe und anschließendem Entzug beobachteten wir, wie sich die Abgabe an Dopamin, je nach Entzugszeit, allmählich gegenüber den Kontrollwerten steigerte, bis die Abgabe an Dopamin schneller verlief als an Schnitten von Kontrolltieren. Verabreichung des Opiat-Antagonisten Naloxon, der unter den vorliegenden Bedingungen Morphin von den spezifischen Rezeptoren verdrängt und somit einen Morphinentzug hervorrief, hatte ähnliche Wirkung wie der "spontane" Entzug.

Diese Veränderung im Dopaminhaushalt durch Morphin, je nachdem ob akut oder chronisch oder im Entzug untersucht, läßt auf einen Adaptionsprozess gegenüber der akuten Hemmung der Dopaminabgabe

durch das Morphin schließen. Ferner zeigten die in vitro Befunde eine gute Übereinstimmung mit Morphineffekten in vivo: Symptome einer verminderten dopaminergen Übertragung (Verminderung der spontanen Motilität, Katalepsie etc.) nach einmaliger Gabe von Morphin, Hervortreten von Symptomen einer erhöhten dopaminergen Übertragung infolge chronischer Morphinverabreichung und besonders im Entzug.

Nach den vorausgegangenen Untersuchungen hat sich also gezeigt, daß die Wirkung von Morphin, welches mit einem spezifischen Rezeptor reagiert, auf die Schnitte des Striatums ein Modell sein kann, um den Mechanismus der Gewöhnung und Abhängigkeit von Arzneimitteln auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) P. Glees, Das menschliche Gehirn, Hyppokrates Verlag, Stuttgart (1969)
2) J. R. Smythies, Brain mechanismus and behaviour, Blackwell Scientific Publ., Oxford and Edingburgh (1970)
3) H. S. Bachelard, Biochemie des Gehirns, G. Fischer Verlag, Stuttgart (1975)
4) L. S. Goodman, A. Gilman, The pharmacological basis of therapeutics, The Macmillian Company, London (1970)
5) M. Vogt, Br. med Bull 29, 168 (1973)
6) J. P. Schadé, Die Funktion des Nervensystems, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1973)
7) L. L. Iversen, B. A. Callingham, Adrenergic transmission in fundamentals of biochemical pharmacology Z. M. Bacq. (ed), Pergamon Press (1971), 253 u. f.
8) P. B. Molinoff, J. Axelrod, Ann. Rev. Biochem. 40, 465 (1971)
9) O. Hornykiewicz, Pharmacol. Rev. 18, 926 (1966)
10) A. Carlsson, M. Lindquist, T. Magnusson, B. Waldeck, Science 127, 471 (1958)
11) K. A. Montagu, Nature, 180, 244 (1957)
12) K. Kuschinsky, O. Hornykiewicz, Eur. J. Pharmacol. 19, 119, (1972)
13) G. Stille, Arzneim. Forsch. 21, 800 (1971)
14) H. A. Sasame, J. Perez-Cruet, G. Di Chiara, A. Tagliamonte, P. Tagliamonte, G. L. Gessa, Riv. Farmacol. Terap. 11, 99 (1971)
15) J. W. Phillis, Pharmacology of Synapses, Pergamon Press (1970)
16) H. Ehringer, O. Hornykiewicz, Klin. Wschr. 38, 1236 (1960)
17) K. G. Lloyd, Biogenic amines and related enzymes in the human and animal brain. Ph. D. Thesis, Universitis of Toronto
18) K. Kuschinsky, Klin. Waschr. 50, 401 (1972)
19) Å. Bertler, E. Rosengren, Acta physiol. scand. 47, 350 (1959b)
20) A. Cheramy, M. J. Besson, J. Glowinski, Eur. J. Pharmacol. 10, 206 (1970)
21) K. Akert, P. G. Waser, Progr. Brain. Res. 31, 73 (1965)
22) W. J. Vaastra, L. Eigeman, Eur. J. Pharmacol. 25, 185 (1974)
23) M. Mavrojannis, Comp. Rend. Soc. Biol. 55, 1092 (1903)
24) J. M. Van Rossum, Arch. Intern. Pharmacodyn. Therap. 160, 492, (1967)
25) C. C. Smith, E. G. Lehman, J. L. Gilfillan, Federadion Proc. 10, 335, (1951)

26) N. E. Andén, B. F. Roos, B. Werdinius, Life Sci. 7, 448 (1963)

27) K. Kuschinsky, O. Hornykiewicz, Eur. J. Pharmacol. 26, 41 (1974)

28) B. Celsen, K. Kuschinsky, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284, 159 (1974)

29) R. J. Hitzemann, H.H. Loh, Eur. J. Pharm. 21, 121 (1963)

30) J. Glowinski, Effects of amphetamines on various aspects of catecholamine metabolism in the central nervous system of the rat. in E. Costa, S. Garattini
Amphetamines and related compounds 301-31 (.N.Y. 1970. Raven Press

31) J. Axelrod, J. Pharm. Exp. Ther. 110, 315 (1954)

32) A. Randrup, J. Munkvad, Biochemical, anatomical and psychological investigations of stereotyped behaviour induced by amphetamine in E. Costa, S. Garattini
Amphetamines and related compounds S. 695, New York. 1970

33) T. Lewander, G. Moliis, J. Brus, On amphetamine tolerance and abstinence in rats, Frontiers in catecholamine research 1973, S. 987 Pergamon Press, G. B.

34) P. Feltz, J. de Champlain, The postsynaptic effect of amphetamine on striatal dopamine sensitive neurones, Frontiers in catecholamine research 1973, S. 951, Pergamon Press G. B.

35) J. v. Dingell, F.Sulser, J. R. Gillette, J. Pharmacol. exp. Ther. 143, 14 (1964)

36) L. M. Gunne, Acta physiol. scand. Suppl. 204 (1963)

37) K. B. Cairncross, S. Gershan, J. H. Gust, J. of Neuropsychiat. 4, 224 (1963)

38) H. Corrodi, K. Fuxe, T. Hökfelt , J. Pharmacy. Pharmacol. 18, 821 (1966)

39) A. Carlsson, J. Engel, U. Stromborn, T. H. Svenson, B. Waldeck, Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 117, (1974)

40) L. Ahtee, K. Erksson, Acta physio. scand. 93, 563 (1975)

41) T. Persson, B. Waldeck, J. Pharmacy. Pharmacol. 23, 377 (1971)

42) P. Lidbrink, H. Corrodi, K. Fuxe, L. Olson, Brain. Res. 45, 507 (1972)

43) H. Blaschko, Experientia 13, 9 (1957)

44) E. Joel, A Ettinger, Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 115, 334, (1926)

45) J. W. Kebabian, G. L. Petzold, P. Greengard, Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2145, (1972)

46) H.O.J. Collier, Nature, 220, 228, (1968)
47) C. B. Smith, Neurotransmitter and the narcotic analgesic in chemical and biological aspects of drug dependence S.J. Mule, H. Brill, 495, The chemical rubber comp. Cleveland 1972
48) S. K. Puri, H. Lal, Psychopharm. 32, 113, (1970)
49) H. W. Kosterlitz, J. Hughes, Life, Sci. 17, 91 (1975)
50) J. Bläsig, A. Herz, K. Reinhold, S. Zieglgänsberger , Psychopharmacol. 33, 19 (1973)
51) J. Bläsig, R. Papeschi, A. Herz, Arzneim.-Forsch. 24, 1015 (1974)
52) P. Theiss, A. Herz, J. Bläsig, Arzneim.-Forsch. 24, 1014 (1974)
53) J. L. Coyle, S. H. Snyder, J. Pharmacol exp. Ther. 170, 221 (1969)
54) J. E. Harris, R. J. Baldessarini, Life Sci. 13, 303 (1973)
55) P. Karlson, Biochemie, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1975)
56) H. Netter, Theoretische Biochemie, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1959)
57) J. Häggendal, Scand. J. Clin. Lab.Invest. 14, 537, (1962)
58) R. Segura-Cordona, K. Soehring, Med. exp. 10, 251, (1964)
59) H. K. Mangold, Isotopentechnik, In Dünnschichtchromatographie, E. Stahl, Springer Verlag (1967)
60) H. R. Schütte, Radioaktive Isotopen in der organischen und Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim (1966)
61) A. Philippu, J. Beyer, Pharmacol. 278, 387, (1973)
62) L. O. Farnebo , B. Hamberger, Acta Physiol. scand. Suppl. 371, 35 (1971)
63) L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder, Handbook of Psychopharmacology III Chapter 2, S. 37, R.J. Baldessarini, Release of catecholamines, Plenum Press 1975 N.Y.
64) H. A. Krebs, K. Henseleit, Hoppe Seyler's Zeitschrift physiol. Chem. 210, 33 (1932)
65) J. H. Passmann, N. S. Radin, J. A. Cooper, Analytic. Chem. 28, 484, (1956)
66) D. L. Hansen, E. T. Bush, Anal. Biochem. 18, 320, (1967)
67) R. J. Herberg, Analytic. Chem. 32, 42 (1960)
68) P. N. Campbell, J. R. Sargent, Bd. 3, Techneques in Proteinbiosythesis Chapter 3, S. 68. J.C. Turner, A critical review liquid scintillationcounting technique. Acad. Press. London (1973)

69) R. Mongomery, C. A. Swenson, Quantitative Problems in the biochemical sciences S. 201, Freeman & Comp. San Francisco (1969)

70) A. Bertler, A. Carlsson, E. Rosengren, Acta physicol. scand. 44, 273 (1958)

71) A. Carlsson, B. Waldeck, Acta physiol. scand. 44, 294 (1958)

72) U. S. v. Euler, J. Flodung, Acta physiol. scand. 33, Supp 118, 45 (1955)

73) H. Blaschko, E. Muscholl, Catecholamines, Handbuch der exp. Pharmakologie XXXIII, 538, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, N.Y. (1972)

74) E. T. Iwamoto, J. K. Ho, E. L. Way, J. Pharmacol. exp. therap. 187, 558 (1973)

75) H. Montel, K. Starke, H. D. Taube, Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 371 (1974)

76) H. Montel, K. Starke, F. Weber, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 357 (1974)

77) E. Eidelberg, A. S. Schwartz, Nature, 225, 1152 (1970)

78) A. S. Schwartz, P. L. Marchok, Nature, 248, 257 (1974)

79) J. Maruyama, A. E. Takemori, Pharmacol. exper. therap. 185, 602 (1973)

80) A. Herz, J. Bläsig, R. Rapeschi, Psychopharmacol. 39, 121 (1974)

81) V. Altenburg, K. Kuschinsky, Naunyn Schmiedeberg's Arch, Pharmacol. 270, R3 (1971)

82) A. S. Schwartz, E. Eidelberg, Life Sci. 9 I, 613 (1970)

83) L. G. Eltherington, C. D. Barnes, Drug dosage laboratory animals, A. Handbook: Univ. of, Cal. Press, Berkeley, Los Angeles 1966

84) L. L. Iversen, Br. med. Bull 29, 130 (1973)

85) D. F. Sharman, Br. med. Bull 29, 110 (1973)

86) E. J. Farris, J. Q. Griffith, The rat laboratory investgation (1942) J.B. Lippnicolt Comp., London

87) A. E. Halaris, K. T. Belendiuk, D. X. Freeman, Biochem. Pharm. 24, 1896 (1975)

88) R. K. Mishra, R. Katzman, E. L. Gardner, M. H. Makman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3883 (1974)

89) K. Kuschinsky, B. Celsen, A. Huppertz, Int. J. Clin. Pharmacol. 12, 129 (1975)

90) K. Kuschinsky, Life Sciences 17, 43 (1975)

91) L. Sachs, Statistische Auswertungsmethoden, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New. York

92) J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, L.A. Fothergill, B.A. Morgan, H.R. Morris, Nature, 258, 577 (1975)

93) L. Terenius, A. Wahlström, Acta physiol. scand., 94, 74 (1975)

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1973 - Januar 1976 am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen.

Herrn Professor Dr. W. Vogt danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit durch Institutsmittel.

Herrn Priv.Doz. Dr. A. Zeeck bin ich für sein Interesse und die Übernahme des Referats dankbar.

Mein Dank gilt ausserdem allen Mitarbeitern der Abteilung Biochemische-Pharmakologie, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders möchte ich mich bei Frau H. Kügler für die zahlreichen photographischen Arbeiten bedanken.

Für wissenschaftlichen Unterricht danke ich meinen akademischen Lehrern, den Herren Professoren und Dozenten:

Dr. Bingel, Dr. Boldt, Dr. Brockmann, Dr. Erdmann, Dr. Flammersfeld, Dr. Glemser, Dr. Haas, Dr. Henatsch, Dr. Hilsch, Dr. Jost, Dr. Klessinger, Dr. Lüttke, Dr. de Meijere, Dr. Müller, Dr. Nölting, Dr. Richtering, Dr. Roesky, Dr. Schöllkopf, Dr. Spiteller, Dr. Wagner, Dr. Zeeck, Dr. Ziegler.

Lebenslauf

Am 29. April 1946 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Theo Huppertz und seiner Ehefrau Ilse, geb. Quärengässer in Pößneck/Thüringen geboren.
Von 1952 bis 1957 besuchte ich die Volksschulen in Düsseldorf-Benrath und Dormagen, dem schloß sich ein sechsjähriger Realschulbesuch an. Nach der mittleren Reife besuchte ich die Dr. Halbach-Schule in Düsseldorf und legte am 28. Juni 1966 an der Rudolf-Koch-Schule in Offenbach/Main die externe Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1966/67 imatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität zu Göttingen für das Fach Chemie. Im Oktober 1970 legte ich das Diplomvorexamen und im Oktober 1972 das Diplomhauptexamen für Chemiker ab.
Seit 1973 war ich am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in der Abteilung für Biochemische Pharmakologie mit der Anfertigung meiner Doktorarbeit unter der Anleitung von Herrn Privatdozenten Dr. K. Kuschinsky beschäftigt. Hier erhielt ich ein Stipendium der Max-Planck-Gesellschaft.
Seit dem 20. Juni 1974 bin ich mit dem Diplomchemiker Dieter Bosse verheiratet.